

Nederlandsch Octrooibureau

A 1 9 9 9

Octrooigemachtigden
European Patent Attorneys

Merken- & Modellen-
gemachtigden
Trademark Design
Attorneys

Certified Netherlands translation of a European Patent (Art 65 EPC)

Patent number 0869167

Patentee Novozymes A/S

Application filed on 9 December 1997

Application number 97610056.0

Patent mentioned in
European Patent Bulletin 30 October 2002

Patent will expire on 9 December 2017

Annuities for maintaining
the patent will be due on 31 December

Filing date of certified
Netherlands translation 30 January 2003

01/2003

Correspondentie / Correspondence
Postbus 29720 / P.O. Box 29720
2502 LS Den Haag / 2502 LS The Hague
The Netherlands
E-mail: info@octrooibureau.nl
www.octrooibureau.nl

Bureau Den Haag
Scheveningsweg 82 2517 KZ Den Haag
Tel: +31 (0)70 352 75 00 Fax: +31(0)70 352 75 28
Bureau Wageningen
Agro Business Park 48 6708 PW Wageningen
Tel: +31 (0)317 479 790

Her Nederlandsch Octrooibureau
is een maatschap die bestaat uit
beroepsvennootschappen. Iedere
aansprakelijkheid is beperkt tot het
bedrag dat in het desbetreffende geval
onder onze beroepsaansprakelijkheids-
verzekering wordt uitbetaald.

Nederlandsch Octrooibureau is
a partnership of professional
corporations. Any liability shall
be limited to the amount which
is paid out under the firm's
professional liability policy
in the matter concerned.

BEST AVAILABLE COPY

NZAS-0008055

113

Nederlandsch Octrooibureau

A... 1999

Octrooigemachtigden
European Patent Attorneys

Merken- & Modellen-
gemachtigden
Trademark Design
Attorneys

VERKLARING

=====

Ondergetekende,
Dr B. Swinkels
ingeschreven in het Register van Octrooigemachtigden
bedoeld in Artikel 3 van het Octrooigemachtigdenreglement
betreffende het optreden als gemachtigde voor de Octrooi-
raad, verklaart hierbij dat de aangehechte vertaling naar
zijn beste weten een volledige en getrouwe vertaling is
van de tekst van het Europese octrooischrift nr.
0 869 167 (B1).

's-Gravenhage,

30 januari 2003



Correspondentie / Correspondence
Postbus 29720 / P.O. Box 29720
2502 LS Den Haag / 2502 LS The Hague
The Netherlands
E-mail: info@octrooibureau.nl
www.octrooibureau.nl

Bureau Den Haag
Scheveningseweg 82 2517 KZ Den Haag
Tel: +31 (0)70 352 75 00 Fax: +31(0)70 352 75 28
Bureau Wageningen
Agro Business Park 48 6708 PW Wageningen
Tel: +31 (0)317 479 790

Her Nederlandsch Octrooibureau
is een maatschap die bestaat uit
beroepsvennootschappen. Iedere
aansprakelijkheid is beperkt tot het
bedrag dat in het desbetreffende geval
onder onze beroepsaansprakelijkheids-
verzekering wordt uitbetaald.

Nederlandsch Octrooibureau is
a partnership of professional
corporations. Any liability shall
be limited to the amount which
is paid out under the firm's
professional liability policy
in the matter concerned.

NZAS-0008056

Publicatienummer: 0 869 167 B1

Octrooihouder: Novozymes A/S

- 5 Reductie van fosfor bevattende bestanddelen van eetbare oliën met een hoge hoeveelheid niet-hydrateerbare fosfor door toepassing van een fosfolipase, een fosfolipase van een draadvormige schimmel met fosfolipase A- en /of B-activiteit

Beschrijving

10 Gebied van de uitvinding

[0001] De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het reduceren van het gehalte van fosfor bevattende bestanddelen in een eetbare olie, omvattende een hoge hoeveelheid van een niet-hydrateerbare fosfor door het gebruik van een fosfolipase.

- 15 [0002] Verder heeft de onderhavige uitvinding betrekking op een enzym met fosfolipase-activiteit, een gekloneerde DNA-sequentie die voor het enzym met fosfolipase-activiteit codeert, een werkwijze voor het vormen van het enzym en het gebruik van het enzym voor een aantal industriële toepassingen.

20 Achtergrond van de uitvinding

Enzymatische ontgomming van eetbare oliën die een relatief hoge hoeveelheid niet-hydrateerbaar fosforgehalte omvatten.

- 25 [0003] Het is bekend fosfolipase te gebruiken voor enzymatische ontgomming van een met water ontgomde eetbare olie (US 5.264.367, Metallgesellschaft, Röhm), om het fosforgehalte van de door water ontgomde eetbare olie te verminderen.

- [0004] Echter, deze werkwijze kan nog steeds worden verbeterd, in het bijzonder om enzymatische ontgomming van eetbare oliën die een hoge hoeveelheid niet-hydrateerbare fosfor (NHP) en/of relatief hoge hoeveelheden plantaardige gom omvatten.

- 30 [0005] Dientengevolge is een doel van de onderhavige uitvinding een werkwijze te verschaffen voor het verminderen van het gehalte van fosfor bevattende bestanddelen van dergelijke oliën, welke werkwijze het gebruik van een fosfolipase omvat.

(g) een DNA-sequentie die een fragment is van de DNA-sequenties die zijn gespecificeerd in (a), (b), (c), (d), (e), of (f).

5 [0039] Verder is een fosfolipase volgens de uitvinding intensief gekarakteriseerd en gevonden is dat het bij lage pH fosfolipase-activiteit bezit; deze eigenschap maakt het zeer geschikt voor gebruik bij olie-ontgoming. Het fosfolipase is niet membraangebonden, waardoor het voor commerciële productie en zuivering geschikt is.

10 [0040] Derhalve heeft volgens een ander aspect de uitvinding betrekking op een geïsoleerd polypeptide met fosfolipase A activiteit welk polypeptide wordt verkregen van een stam van het geslacht *Fusarium* en bezit

- i) PLA-activiteit in het pH gebied van 3-10, gemeten bij 40°C;
- ii) een molecuulmassa van 29 ±kDa, zoals is bepaald d.m.v. SDS-PAGE;
- 15 iii) een iso-elektrisch punt (PL) in het gebied van 4,5-8;
- iv) een temperatuuroptimum voor fosfolipase-activiteit in het gebied van 25-55°C, gemeten met lecithine als substraat bij een pH van 5; en/of
- v) een pH-optimum voor fosfolipase-activiteit in het pH-gebied van 6-12, gemeten met lecithine als substraat bij 37°C.

20

[0041] Een afgeleide aminozuursequentie van een geïsoleerd fosfolipase volgens de uitvinding wordt in SEQ ID nr. 2 getoond.

[0042] De N-eindstandige aminozuursequentie van een volwaardig uitgescheiden geïsoleerd fosfolipase is bepaald. Deze N-eindstandige sequentie liet zien dat het
25 volwaardige gedeelte van een fosfolipase volgens de uitvinding, met de in SEQ ID nr.2 getoonde aminozuursequentie, begint bij aminozuur nr 31 in SEQ ID nr.2. Zie het werkvoorbeeld hierin voor verdere bijzonderheden (zie hierna).

[0043] Verder is de C-eindstandige sequentie van een actief uitgescheiden fosfolipase volgens de uitvinding, met de in SEQ ID nr.2 getoonde
30 aminozuursequentie, bepaald. Dit C-eindstandige bepaalde fosfolipase werd op recombinante wijze tot expressie gebracht in de draadvormige schimmelstam *Aspergillus oryzae*. Zie het werkvoorbeeld hierin voor verdere referentie.

[0044] Deze resultaten lieten zien dat het enzym tijdens de expressie van *A. oryzae* C-eindstandig werd verwerkt, en de resultaten geven aan dat de Ser303 in SEQ ID nr.2 de meest waarschijnlijke C-eindstandige rest in het tot expressie gebrachte volwaardige actieve enzym is. Echter, het is te voorzien dat zelfs verdere C-eindstandige verwerking kan plaatsvinden (b.v. op basis van een fragment van deze sequenties), waarbij nog steeds een volwaardig actief enzym tot expressie wordt gebracht.

[0045] Derhalve heeft de uitvinding volgens een ander aspect betrekking op een geïsoleerd enzym dat fosfolipase A- en/of B-activiteit bezit en gekozen wordt uit de groep omvattende;

10

(a) een polypeptide dat wordt gecodeerd door het gedeelte van de DNA-sequentie dat voor het fosfolipase A- en/of B-enzym codeert, dat gekloneerd is in plasmide pYES 2.0, aanwezig in *Escherichia coli* DSM 11299;

(b) polypeptide met een aminozuursequentie zoals getoond in posities 31-346 in SEQ ID nr. 2;

(c) polypeptide met een aminozuursequentie zoals getoond in posities 31-303 in SEQ ID nr. 2;

(d) een analoog van het polypeptide gedefinieerd in (a), (b) of (c) welke analoog tenminste 70% homoloog met het polypeptide is; en

(e) een fragment van (a), (b), (c) of (d)

[0046] De uitvinding verschaft volgens een ander aspect een recombinante expressievector welke de heterologe recombinante productie van een enzym volgens de uitvinding mogelijk maakt. Daardoor is het mogelijk een sterk gezuiverd fosfolipasepreparaat te vormen dat wordt gekenmerkt doordat het vrij van homologe onzuiverheden is. Dit is voor een aantal industriële toepassingen zeer voordelig.

[0047] De onderhavige uitvinding toont op experimentele wijze aan (zie hierna) dat een fosfolipase dat verkregen is van zowel een stam van *Fusarium Culmorum* als *Fusarium oxysporum*, verbeterde eigenschappen bezit voor gebruik in industrieel relevante toepassingen. Het is te voorzien dat fosfolipasen die verkregen zijn van een stam van het geslacht *Fusarium*, verbeterde eigenschappen zullen bezitten die relevant zijn voor het gebruik in industrieel relevante toepassingen.

[0048] Derhalve heeft de uitvinding volgens nog een ander aspect betrekking op het gebruik van een fosfolipase, verkregen van een stam van het geslacht *Fusarium*, zoals een stam van *F.culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani*, of in het bijzonder een stam van *Fusarium oxysporum*, in een werkwijze die de behandeling van een fosfolipide of lysofosfolipide met het fosfolipase omvat, teneinde vetacylgroepen te hydrolyseren.

[0049] Ten slotte heeft de uitvinding betrekking op een geïsoleerde, in hoofdzaak zuivere biologische kweek van de *Escherichia coli*-stam DSM nr. 11299, die een voor fosfolipase coderende DNA-sequentie omvat (het voor fosfolipase coderende gedeelte van de DNA-sequentie die gekloneerd is in plasmide pYES 2.0, aanwezig in *Escherichia coli* DSM 11299) verkregen van een stam van de draadvormige schimmel *Fusarium oxysporum*, of één of andere mutant van deze *E.coli*-stam die het vermogen heeft behouden, voor fosfolipasen te coderen.

15 Vergelijking van sequentiehomologie met de stand van de techniek

[0050] Een homologie-onderzoek met het fosfolipase volgens de uitvinding in nucleotide- en eiwitdatabasen werd uitgevoerd. Het homologie-onderzoek liet zien dat de meest nauwverwante bekende sequentie een lipase van *Fusarium heterosporum* was (een aminozuurrangschikking wordt in Fig.1 getoond).

[0051] De DNA-sequentie volgens de uitvinding (SEQ ID nr.1 23-1060) die voor het fosfolipase codeert, vertoont slechts 62% DNA-homologie met de bekende lipasesequentie van *Fusarium heterosporum* (Genbank databasereferentie S77816), en de overeenkomstige aminozuursequentie van het fosfolipase volgens de uitvinding toont slechts 60% homologie met een afgeleide aminozuursequentie gebaseerd op de hierboven vermelde bekende DNA-sequentie (zie Fig.1).

[0052] Dit laat zien dat de DNA-sequentie en/of de aminozuursequentie van een fosfolipase volgens de uitvinding inderdaad van elke bekende DNA-sequentie(s) en/of aminozuursequentie(s) verschilt.

30 [0053] Een cDNA-sequentie die voor een fosfolipase B van *Penicillium notatum* codeert, is beschreven (Eur. J. Biochem. 202: 783-787, 1991. Echter, deze DNA-sequentie (Genbank databasereferentie X60348) vertoont slechts een zeer beperkte DNA-gelijkheid van 39% met de DNA-sequentie volgens de onderhavige uitvinding

(SEQ ID nr. 1, 23-1060), en de overeenkomstige aminozuursequentie van het fosfolipase volgens de uitvinding (SEQ ID nr. 2) toont slechts 20% gelijkheid met een afgeleide aminozuursequentie, gebaseerd op de hierboven vermelde bekende PLB-DNA-sequentie.

- 5 [0054] De berekening van de homologie werd uitgevoerd zoals later in deze beschrijving is beschreven.

Tekeningen

- 10 [0055] Fig.1: Rangschikking van de aminozuursequentie, getoond in SEQ ID Nr. 2 met een lipase sequentie volgens de stand van de techniek van *Fusarium heterosporum*.

[0056] Fig.2: vergelijking van het vermogen van enzymatische ontgomming van LecitaseTM en een fosfolipase van *Fusarium oxysporum* volgens de uitvinding.

15

Definities

[0057] Voorafgaand aan het verder in bijzonderheden bespreken van deze uitvinding zullen de volgende uitdrukkingen worden gedefinieerd.

- 20 [0058] "Een gekloneerde DNA-sequentie": de uitdrukking "een gekloneerde DNA-sequentie" heeft betrekking op een DNA-sequentie die is gekloneerd volgens standaard kloneringswerkwijzen die bij genetische modificatie worden toegepast om een segment van DNA van de natuurlijke lokatie ervan te verplaatsen naar een andere plaats waar het zal worden gereproduceerd. De kloneringswerkwijzen omvat het uitknippen en
25 isoleren van het gewenste DNA-segment, het inserteren van het stukje DNA in het vectormolecuul en het opnemen van de recombinante vector in een cel waarin meerdere kopieën of klonen van het DNA-segment zullen worden gerepliceerd.

[0059] De "gekloneerde DNA-sequentie" volgens de uitvinding kan daarnaast worden aangeduid als "DNA-construct" of "een gekloneerd polynucleotide met een
30 DNA-sequentie" of "geïsoleerde sequentie".

[0060] "Verkregen van:" Voor het doel van de onderhavige uitvinding betekent de uitdrukking "verkregen van", zoals hierin gebruikt in verband met een specifieke microbiële bron, dat het enzym en diens gevolg de DNA-sequentie die voor het

enzym codeert, wordt gevormd door de specifieke bron of door een cel waarin een gen van de bron is geïnserteerd.

[0061] "Een geïsoleerd polypeptide" Zoals hierin is gedefinieerd, omvat de uitdrukking "een geïsoleerd polypeptide" of een "geïsoleerd fosfolipase", zoals wordt
 5 gebruikt in verband met het fosfolipase volgens de uitvinding, een fosfolipase of een gedeelte van een fosfolipase dat in hoofdzaak vrij van andere niet-fosfolipasepolypeptiden is, b.v. tenminste 20% zuiver, bij voorkeur tenminste 40% zuiver, met meer voorkeur 60% zuiver, met zelfs meer voorkeur 80% zuiver, met nog meer voorkeur 90% zuiver, en met de meeste voorkeur 95% zuiver, zoals bepaald met
 10 behulp van SDS-PAGE.

[0062] Als het geïsoleerde polypeptide tenminste 60% zuiver is, kan de uitdrukking "een sterk geïsoleerd polypeptide" worden gebruikt. Het "geïsoleerde polypeptide" kan daarnaast worden aangeduid als "gezuiverd polypeptide".

[0063] "Homologe onzuiverheden:" Zoals hierin wordt gebruikt, betekent de
 15 uitdrukking "homologe onzuiverheden" elke onzuiverheid (b.v. een ander polypeptide dan het enzym volgens de uitvinding) die afkomstig is van de homologe cel waarvan het enzym volgens de uitvinding oorspronkelijk is verkregen. In de onderhavige uitvinding kan de homologe cel b.v. een stam van *Fusarium oxysporum* zijn.

[0064] "Voor fosfolipase coderend gedeelte": Zoals hierin wordt gebruikt, betekent
 20 de uitdrukking "voor fosfolipase coderend gedeelte", als dit wordt gebruikt in samenhang met een DNA-sequentie, het gebied van de DNA-sequentie dat overeenkomt met het gebied dat in een polypeptidesequentie is getranslateerd.

[0065] In de in SEQ ID NR 1 getoonde DNA-sequentie is dit het gebied tussen het eerste "ATG"-startcodon ("AUG"-codon in mRNA) en het volgende stopcodon
 25 ("TAA", "TAG" of "TGA").

[0066] Het getranslateerde polypeptide kan verder, naast de volwaardige sequentie die fosfolipase-activiteit bezit, een N-eindstandige signaal- en/of pro-peptidesequentie omvatten. De signaalsequentie geleidt in het algemeen de uitscheiding van het polypeptide en het pro-peptide geleidt in het algemeen de opvouwing van het
 30 polypeptide. Voor verder informatie zie Egnell, P. et al., Molecular Microbiol. 6(9):1115-19 (1992) of Stryer, L., "Biochemistry" W.H., Freeman and Company/New York, ISBN 0-7167-1920-7.

- [0067] "Modificatie(s) van een DNA- en/of aminozuursequentie": de uitdrukking "modificatie(s)", indien deze wordt gebruikt in samenhang met modificatie(s) van een DNA- en/of aminozuursequentie, zoals hierin wordt besproken, wordt gedefinieerd als zowel chemische modificatie alsook genetische modificatie(s) te omvatten. De
- 5 modificatie(s) kan (kunnen) substitutie, deletie en/of insertie in of op het (de) van belang zijnde aminozu(u)r(en) omvatten.
- [0068] "Fosfolipase A": Met de uitdrukking "fosfolipase A", zoals hierin wordt gebruikt in samenhang met een enzym volgens de uitvinding, wordt bedoeld dat een enzym met fosfolipase A1- en/of fosfolipase A2-activiteit wordt omvat.
- 10 [0069] Fosfolipase A1 wordt gedefinieerd volgens de standaard enzym-EC-classificatie als EC-3.1.1.32.

Officiële naam: fosfolipase A1 (PLA 1).

Gekatalyseerde reactie:

15 fosfatidylcholine + H₂O ⇌

2-acylglycerofosfocholine + vetzuuranion opmerking(en):

heeft een veel bredere specificiteit dan ec 3.1.1.4

Fosfolipase A2 wordt volgens de standaard enzym-EC-classificatie gedefinieerd als EC 3.1.1.4

20 Officiële naam: fosfolipase A2 (PLA 2).

Alternatieve naam (namen): fosfatidylcholine-2-acylhydrolase, lecithinase a; fosfatidase; of fosfatidolipase.

Gekatalyseerde reactie:

fosfatidylcholine + h₂o ⇌

25 1-acylglycerofosocholine + vetzuuranion opmerking(en): werkt eveneens in op fosfatidylethanolamine, cholineplasmalogen en fosfatiden, waardoor het aan de 2-positie gehechte vetzuur wordt verwijderd.

"Fosfolipase B": Fosfolipase B is gedefinieerd volgens de standaard enzym EC-classificatie als EC 3.1.1.5.

30 Officiële naam: lysofosfolipase

Alternatieve naam (namen): lecithinase b; lysolecithinase; fosfolipase b, of plb

Gekatalyseerde reactie: 2-lysofosfatidylcholine + h₂o ⇌

Glycerofosfocholine + een vetzuuranion

[0070] "Fosfolipase-activiteit": met de uitdrukking "fosfolipase-activiteit" of "met fosfolipase-activiteit/die fosfolipase-activiteit bezit" zoals hierin wordt gebruikt, in samenhang met een enzym volgens de uitvinding, wordt bedoeld een enzym te
 5 specificeren met ten minste de hoeveelheid fosfolipase-activiteit (ofwel PLA ofwel PLB), hierna experimenteel gedefinieerd.

[0071] Dienovereenkomstig wordt een enzym dat fosfolipase-activiteit bezit, hierin gedefinieerd als een enzym dat in de "monolaag-fosfolipasebepaling", getoond in voorbeeld 6 hierin, (zie hierna) een fosfolipase-activiteit bezit van ten minste 0,25
 10 nmol/min, een enzymdosis: 60 µg, bij 25°C; met meer voorkeur ten minste 0,40 nmol/min, enzymdosis: 60 µg bij 25°C; met meer voorkeur ten minste 0,75 nmol/min, enzymdosis: 60 µg bij 25°C; met meer voorkeur ten minste 1,0 nmol/min, enzymdosis: 60 µg bij 25°C; met meer voorkeur ten minste 1,25 nmol/min, enzymdosis: 60 µg bij 25°C, en met zelfs meer voorkeur ten minste 1,5 nmol/min, enzymdosis: 60 µg bij
 15 25°C.

[0072] Thans wordt aangenomen dat alleen een enzym met een dergelijke aanzienlijke fosfolipase-activiteit van industrieel belang is, bijvoorbeeld voor gebruik bij ontgomming (US 5.264.367)

[0073] "Een lipase met fosfolipase-nevenactiviteit": De uitdrukking "een lipase met fosfolipase-nevenactiviteit" wordt dienovereenkomstig gedefinieerd als een lipase met fosfolipase-nevenactiviteit, waarbij de fosfolipase-nevenactiviteit in de "monolaag-fosfolipasebepaling", zoals in voorbeeld 6 wordt getoond, minder is dan de hierboven vermelde cijfers.

[0074] Een aantal lipasen bezit een dergelijke fosfolipase-nevenactiviteit. In het werkvoorbeeld 6 hierin (zie hierna) worden sommige van de lipasen met fosfolipase-nevenactiviteit getoond.

[0075] "Een onzuivere olie": Een onzuivere olie (eveneens aangeduid als een niet-ontgomde olie) kan een geperste of geëxtraheerde olie of een mengsel daarvan zijn, b.v. raapzaad, sojaboon of zonnebloem. Het fosfatidegehalte in een onzuivere olie kan
 30 variëren van 0,5-3% gew./gew. overeenkomend met een fosforgehalte in het gebied van 200-1200 ppm, met meer voorkeur in het gebied van 250-1200 ppm. Naast de fosfatiden bevat de onzuivere olie eveneens kleine concentraties koolhydraten, suikerverbindingen en metaal/fosfatidezuurcomplexen van Ca, Mg en Fe.

[0076] "Een half-onzuivere olie": elke olie die niet een onzuivere olie is, maar die een fosfatidegehalte van meer dan 250 ppm, met meer voorkeur meer dan 500ppm, bezit. Een dergelijke olie zou b.v. worden verkregen door het onderwerpen van een onzuivere olie aan een werkwijze die vrijwel gelijk is aan de hierna beschreven werkwijze voor "met water ontgomde olie".

[0077] "Met water ontgomde olie": Een met water ontgomde olie wordt doorgaans verkregen door het mengen van 1-3 % gew..gew. heet water met warme onzuivere olie (60-90°C). Gebruikelijke behandelperioden zijn 30-60 minuten. De stap van met water ontgommen verwijderd de fosfatiden en de plantaardige gommen die in de olie onoplosbaar worden na hydratatie. De gehydrateerde fosfatiden en gommen kunnen van de olie worden afgescheiden door bezinken, filtratie of centrifugatie, waarbij centrifugatie de meer voorkomende praktijk is.

[0078] Het essentiële doel bij de werkwijze van met water ontgommen is het afscheiden van de gehydrateerde fosfatiden van de olie. Het mengen van heet water in de olie, zoals hierboven is beschreven, moet hierin ruim worden opgevat als het mengen van een waterige oplossing in de olie volgens standaardwerkwijzen voor ontgommen met water volgens de stand van de techniek.

[0079] Als alternatief kan de werkwijze die hierin wordt aangeduid als "met water ontgommen van olie" worden aangeduid als "natte zuivering onder verwijdering van plantaardige gom" (zie US 5.264.367).

Gedetailleerde beschrijving van de uitvinding

Werkwijze voor het enzymatisch ontgommen van een eetbare olie die een grote hoeveelheid niet-hydrateerbare fosfatiden/fosfolipiden omvat

[0080] Voor de onderhavige uitvinding wordt de hoeveelheid niet-hydrateerbare fosfor in een eetbare olie gemeten door

- i) voorbehandelen van de eetbare olie, bij 60°C, door toevoeging van een oplossing, die bestaat uit citroenzuurmonohydraat in water (het toegevoegde water ten opzichte van olie is gelijk aan 4,8% gew./gew.; [citroenzuur] in waterfase=106 mM, in water/olie emulsie= 4,6 mM) gedurende 30 minuten;
- ii) overbrengen van 10 ml van de voorbehandelde water-in-olie-emulsie naar een buis;
- iii) 30 minuten verwarmen van de emulsie in een bad met kokend water;
- iv) 10 minuten centrifugeren bij 5000 rpm;

- v) overbrengen van ongeveer 8 ml van de bovenste (olie) fase naar een nieuwe buis en deze 24 uur laten staan (om te bezinken);
- vi) na bezinken het onttrekken van 2 g van de bovenste heldere fase voor het meten van het gehalte niet-hydrateerbare fosfor (ppm) in de eetbare olie
- 5
- [0081] Voor verdere bijzonderheden wordt naar de werkvoorbeelden hierin verwezen.
- [0082] Zoals in de werkvoorbeelden hierin wordt geïllustreerd, verschilt de fosfolipidesamenstelling (hydrateerbaar ten opzichte van niet-hydrateerbaar
- 10 fosfolipide) van verschillende eetbare oliën aanzienlijk. Dientengevolge zal het niveau van het resterende fosfolipide in verschillende met water ontgomde oliën over een breed gebied (b.v. van ongeveer 30 ppm tot 200 ppm) variëren.
- [0083] Voor enzymatisch ontgommen hangt de optimale enzymdosering af van de hoeveelheid niet-hydrateerbare fosfatiden die na ontgomming met water of
- 15 voorbehandeling met citroenzuur/water zoals hierboven is gedefinieerd, aanwezig is.
- [0084] Verder geldt dat hoe hoger de hoeveelheid niet-hydrateerbare fosfatiden in de olie is, des te efficiënter de werkwijze van enzymatische ontgomming is.
- [0085] De onderhavige uitvinding verschaft een werkwijze voor het verwijderen van de hoeveelheid NHP in olie die een relatief hoge hoeveelheid NHP omvat.
- 20 [0086] Bij voorkeur omvat de eetbare olie een gehalte niet-hydrateerbare fosforgehalte van ten minste 60 ppm, met meer voorkeur ten minste 100 ppm en met zelfs meer voorkeur ten minste 200 ppm.
- [0087] Met meer voorkeur omvat de eetbare olie een gehalte niet- hydrateerbare fosfor in het gebied van 60-500 ppm, met meer voorkeur ten minste in het gebied van
- 25 100-500 ppm en met zelfs meer voorkeur in het gebied van 200-500 ppm.
- [0088] Een eetbare olie die is gedefinieerd als een olie met een relatief hoge hoeveelheid niet-hydrateerbare fosfor, volgens de beschrijving hierin, kan een met water ontgomde olie, of met meer voorkeur een onzuivere olie of half-ruwe olie zijn.
- [0089] Dienovereenkomstig heeft een uitvoeringsvorm van de uitvinding
- 30 betrekking op een werkwijze volgens het eerste aspect van de uitvinding, waarbij de eetbare olie een onzuivere olie is, met het kenmerk dat deze onzuivere eetbare olie, voorafgaand aan het uitvoeren van de werkwijze volgens de uitvinding, een olie is met een fosforgehalte van meer dan 250 delen per miljoen (ppm), welke olie niet met water

is ontgomd (ontgommen met water omvat het mengen van heet water in een warme onzuivere olie, gevolgd door het verwijderen van fosfatiden die na hydratatie in de olie niet-oplosbaar worden) voorafgaand aan het uitvoeren van de werkwijze volgens de uitvinding.

- 5 [0090] Bij voorkeur heeft een dergelijke onzuivere eetbare olie, voorafgaand aan het uitvoeren van deze werkwijze volgens de uitvinding, een fosforgehalte van meer dan 350 ppm, met meer voorkeur meer dan 400 ppm, met zelfs meer voorkeur meer dan 500 ppm en met de meeste voorkeur meer dan 600 ppm.

- [0091] Verder heeft deze onzuivere eetbare olie bij voorkeur, voorafgaand aan het
10 uitvoeren van de werkwijze volgens de uitvinding, een fosforgehalte in het gebied van 250-1500 ppm, met meer voorkeur in het gebied van 350-1500 ppm, met zelfs meer voorkeur in het gebied van 500-1500 ppm en met de meeste voorkeur in het gebied van 500-1500 ppm.

- [0092] De werkwijze van enzymatische ontgomming van een onzuivere olie
15 volgens de uitvinding is voordelig ten opzichte van de werkwijze voor enzymatische ontgomming van met water ontgomde eetbare oliën volgens de stand van de techniek (US 5.264.367), aangezien een werkwijze met directe ontgomming voor behandeling van een onzuivere olie, volgens de uitvinding de eerdere stap van het met water ontgommen van de olie zal besparen.

- 20 [0093] Dit bespaart zowel tijd als geld. Een met water ontgomde olie wordt gewoonlijk verkregen door het mengen van heet water in warme (60-90°C) onzuivere olie gedurende gewoonlijk 30-60 minuten. Daarentegen kan de volledige werkwijze van het enzymatisch ontgommen van onzuivere oliën volgens de uitvinding in minder dan 1 uur worden uitgevoerd, met feitelijke enzymatische behandeling gedurende
25 ongeveer 25 minuten. Zie het werkvoorbeeld hierin voor verdere bijzonderheden.

[0094] Verder kan een eetbare olie die wordt gedefinieerd als een olie met een relatief hoge hoeveelheid niet-hydrateerbare fosfor, volgens de beschrijving hierin, een half-onzuivere olie zijn.

- [0095] Dienovereenkomstig heeft een uitvoeringsvorm volgens de uitvinding
30 betrekking op een werkwijze volgens het eerste aspect van de uitvinding, waarbij de eetbare olie een half-onzuivere eetbare olie is, met het kenmerk dat de half-onzuivere eetbare olie, voorafgaand aan het uitvoeren van de werkwijze volgens de uitvinding, een fosforgehalte van meer dan 500 delen per miljoen (ppm) heeft, en waarbij de olie

voorafgaand aan het uitvoeren van de werkwijze volgens de uitvinding met water is ontgomd.

[0096] Bij voorkeur is de half-onzuivere eetbare olie een olie die, voorafgaan aan het uitvoeren van de werkwijze, een fosforgehalte van meer dan 600 delen per miljoen (ppm) heeft, met meer voorkeur meer dan 750 delen per miljoen (ppm).

[0097] In het algemeen zal het met water ontgommen van een eetbare olie het fosforgehalte in de olie tot een niveau onder 500 ppm verminderen.

[0098] Dienovereenkomstig kan een half-onzuivere olie, zoals hierin is beschreven, b.v. slechts gedeeltelijk met water zijn ontgomd, voorafgaand aan het uitvoeren van een werkwijze voor het verminderen van fosfor bevattende bestanddelen in een eetbare olie volgens de uitvinding.

[0099] De uitdrukking "gedeeltelijk met water ontgomd" betekent dat de werkwijze voor het met water ontgommen van de olie alleen een gedeeltelijke/korte werkwijze is geweest in vergelijking met een standaardwerkwijze voor met water ontgommen.

[0100] Een werkwijze met "gedeeltelijk met water ontgommen" kan worden uitgevoerd door het alleen mengen van slechts 0,5% heet water in de olie (standaard is 1-3% heet water) (zie sectie "definities" hierin) of door de behandelingsperiode tot 10 minuten te verminderen (standaard is 30-60 minuten).

[0101] Als alternatief kan een hierin gedefinieerde half-onzuivere olie een mengsel van een onzuivere olie en een half-onzuivere olie zijn.

[0102] Een uitvoeringsvorm volgens de uitvinding heeft betrekking op een werkwijze volgens enig deel van het eerste aspect van de uitvinding, welke uitvoeringsvorm de volgende stappen omvat:

25

i) het instellen van de temperatuur van de eetbare olie op een temperatuur tussen 25°C-70°C;

ii) het 5-120 minuten voorbehandelen van de eetbare olie op de hierboven ingestelde temperatuur door het toevoegen van 0,5-6% (gewichtsprocent betrokken op de olie) van een waterige oplossing die ten minste 85% water omvat, waarbij de voorbehandeling niet wordt gevolgd door het verwijderen van gehydrateerde plantaardige gom en het fosforbestanddeel in de olie;

30

- iii) het instellen van de pH van de water/olie-emulsie op een pH van 1,5-8 (b.v. door het toevoegen van een geschikte
- iv) het in contact brengen van de water-olie-emulsie met een waterige oplossing van een fosfolipase (bij een temperatuur (+/-)5°C ingesteld volgens stap (i)) welk
- 5 fosfolipase in de olie wordt geëmulgeerd totdat het fosforgehalte van de olie tot minder dan 11 ppm is verminderd);
- v) het afscheiden van de waterfase van de behandelde olie.

[0103] De temperatuur van de eetbare olie in stap i) onmiddellijk hierboven wordt
10 bij voorkeur ingesteld op een temperatuur die de temperatuur voor optimale fosfolipase-activiteit van het bij de werkwijze gebruikte enzym is.

[0104] Voor het in de handel verkrijgbare fosfolipase Lecitase™ (Novo Nordisk A/S) is deze ongeveer 60°C en voor een fosfolipase volgens de uitvinding die van de draadvormige schimmel van het geslacht *Fusarium* wordt verkregen, is deze ongeveer
15 45°C. Zie de werkvoorbeelden hierin voor verdere bijzonderheden die hierop betrekking hebben.

[0105] Het is te voorzien dat het grootste gedeelte van draadvormige schimmelfosfolipasen een temperatuuroptimum van ongeveer 35-50°C zal bezitten.

[0106] Dienovereenkomstig heeft een uitvoeringsvorm volgens de uitvinding
20 betrekking op een onmiddellijk hierboven beschreven werkwijze, waarbij de temperatuur van de eetbare olie in stap i) wordt ingesteld op een temperatuur tussen 35°C-50°C, en de in stap iv) gebruikte fosfolipase wordt verkregen van een draadvormige schimmelstam.

[0107] In stap (ii) van de hierboven vermelde werkwijze wordt de eetbare olie 5-
25 120 minuten op de ingestelde temperatuur (stap i) voorbehandeld door het toevoegen van 0,5-6% (gewichtsprocent, betrokken op de olie) van een waterige oplossing die ten minste 85% water omvat, waarbij de voorbehandeling niet wordt gevolgd door het verwijderen van de gehydrateerde plantaardige gom en het fosforbestanddeel in de olie.

[0108] Deze stap is een standaard voorbehandelingsstap in de enzymatische
30 ontgomming van eetbare oliën (US 5.264.367; US 5.558.781). Het doel van stap ii) is het hydrateren van hydrateerbare/hydrofiele bestanddelen (zoals hetgehalte hydrateerbare fosfor) in de eetbare olie, die na hydratatie niet-oplosbaar in de olie wordt.

- [0109] Echter, deze stap verschilt van wat wordt aangeduid als "met water ontgommen van een eetbare olie" in de onderhavige context. Eén belangrijk verschil is dat de voorbehandelingsstap de gehydrateerde fosfatiden en plantaardige gom van de olie niet verwijdt. Verwijdering van de gehydrateerde omvang van de olie is het
- 5 belangrijkste doel van ontgomming met water van eetbare oliën.
- [110] Dienovereenkomstig omvat de olie als het fosfolipase met de olie in stap iv) hierboven in contact is gebracht, nog steeds de gehydrateerde fosfatiden en plantaardige gom.
- [0111] Met andere woorden, indien de eetbare olie een niet met water ontgomde
- 10 eetbare olie is, beschrijft de hierboven vermelde werkwijze een vereenvoudigde enzymatische ontgommingswerkwijze, die de gehydrateerde fosfatiden en plantaardige gom van de olie voorafgaand aan het in contact brengen van de olie met de fosfolipase niet verwijdt.
- [0112] Bij voorkeur omvat de waterige oplossing die ten minste 85% water (stap II
- 15 hierboven) omvat, verder citroenzuur. Bij voorkeur is er 1-15% (gew./gew.) citroenzuur in de waterige oplossing, met meer voorkeur is er 3-11%(gew./gew.) citroenzuur in de waterige oplossing.
- [0113] Bij voorkeur is het tijdsbestek in stap ii) 15-50 minuten, en met meer voorkeur 15-30 minuten.
- 20 [0114] Voor verdere details met betrekking tot de voorbehandeling in stap ii) hierboven wordt verwezen naar de werkvoorbeelden hierin.
- [0115] In stap iii) hierboven wordt de pH van de water/olie-emulsie ingesteld op een pH van 1,5-8 (b.v. door toevoeging van een geschikte hoeveelheid NaOH-oplossing). Dit wordt gedaan teneinde de pH-waarde van de olie in te stellen voordat
- 25 het fosfolipase met de olie in stap iv) in contact wordt gebracht. Over het algemeen zal de feitelijke optimale pH-waarde afhangen van het feitelijke enzym dat is gebruikt om met de olie in stap iv) in contact te brengen. Voor verdere bijzonderheden met betrekking tot dit geval wordt naar de werkvoorbeelden hierin verwezen.
- [0116] In het algemeen heeft het volgens het eerste aspect van de uitvinding en de
- 30 uitvoeringsvormen daarvan de voorkeur, dat het in contact brengen van de olie met een waterige oplossing die een fosfolipase omvat, wordt uitgevoerd bij een pH van 1,5-6, met meer voorkeur bij een pH van 3-6.

[0117] De pH-waarde in het water in de olie-emulsie wordt gemeten door het nemen van 2 ml water van de olie-emulsie en dit te mengen met 2 ml water. Na fasescheiding moet de verkregen bovenlaag weggepipetteerd worden, en moet de pH in de waterige fase worden gemeten. Metingen worden omgezet in "werkelijke" pH-
5 waarden volgens de volgende formule $pH_{\text{werkelijk}} = pH_{\text{gemeten}} - 0,38$. Voor verdere details wordt verwezen naar de werkvoorbeelden hierin.

[0118] Bij voorkeur is bij een werkwijze voor het verminderen van de hoeveelheid fosfor bevattende bestanddelen in een eetbare olie volgens de uitvinding de hoeveelheid fosfolipase die in de olie wordt geëmulgeerd, in het gebied van 0,1-15 mg enzym
10 (droge stof)/kg olie, met meer voorkeur 0,25-5 mg enzym (droge stof)/kg olie, en met zelfs meer voorkeur 0,25-2,5 mg enzym (droge stof)/kg olie.

[0119] In het algemeen is het voordelig zowel de gebruikte hoeveelheid fosfolipasen als de tijd die benodigd is voor enzymatische ontgomming van een eetbare olie te optimaliseren ter verkrijging van een fosforgehalte van minder dan 11 ppm. De
15 feitelijke optimale enzymdosering en de tijdsperiode zal o.a. afhangen van het feitelijk gebruikte fosfolipase. Voor verdere bijzonderheden betreffende de optimalisering van de enzymdosering en de tijdsperiode van de werkwijze wordt verwezen naar de werkvoorbeelden hierin.

[0120] Bij voorkeur wordt in een werkwijze volgens de uitvinding voor het verminderen van de hoeveelheid fosfor bevattende bestanddelen in een eetbare olie het fosforgehalte van de olie tot minder dan 11 ppm verminderd na het in contact brengen van de olie met 0,5-6 mg fosfolipase (droge stof)/kg olie, en waarbij het fosfolipase 1-6
20 uur met de olie in contact is, met meer voorkeur wordt het fosforgehalte in de olie tot minder dan 11 ppm verminderd na het in contact brengen van de olie met 0,25 tot 2,5
25 mg fosfolipase (droge stof)/kg olie, waarbij het fosfolipase 15 minuten tot 2 uur met de olie in contact is.

[0121] Zie de werkvoorbeelden hierin voor verdere bijzonderheden met betrekking tot de identificatie van optimale temperaturen voor afzonderlijke fosfolipasen.

[0122] Bij voorkeur wordt volgens alle aspecten en uitvoeringsvormen van een
30 werkwijze voor het verminderen van de hoeveelheid fosfor bevattende bestanddelen in een eetbare olie volgens de uitvinding het fosforgehalte in de olie tot minder dan 5 ppm verminderd.

- [0123] Het fosforgehalte in de olie wordt gemeten als delen per miljoen (ppm) in de oliefase van het water dat in de olie-emulsie aanwezig is. De analyse van het fosforgehalte wordt uitgevoerd volgens het voorschrift 2.421 in "Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats, and Derivates, 7^{de} ed. (1987)". Voor verdere bijzonderheden wordt verwezen naar de werkvoorbeelden hierin.
- [0124] Een uitvoeringsvorm volgens de uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het verminderen van de hoeveelheid fosfor bevattende bestanddelen in een eetbare olie volgens de uitvinding, waarbij het fosfolipase wordt verkregen van een zoogdierspecies, in het bijzonder waarbij het fosfolipase wordt verkregen van een pancreas van deze zoogdierspecies, en met de meeste voorkeur het fosfolipase wordt verkregen van een varkenspancreas.
- [0125] Bij voorkeur wordt bij een werkwijze voor het verminderen van de hoeveelheid fosfor bevattende bestanddelen in een eetbare olie volgens de uitvinding het fosfolipase van een micro-organisme, bij voorkeur een draadvormige schimmel, een gist of een bacterie verkregen.
- [0126] Bij voorkeur zijn in het geval dat de onmiddellijk hierboven vermeldde draadvormige schimmel een species van het geslacht *Fusarium* is, voorkeursstammen de stammen zoals een stam van *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani* of meer in het bijzonder een stam van *F. oxysporum*.
- [0127] Verder, als de hierboven vermeldde draadvormige schimmel een species van het geslacht *Aspergillus* is, zijn voorkeursstammen, zoals een stam van *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* of meer in het bijzonder *Aspergillus oryzae*.
- [0128] Verder is in een werkwijze voor het verminderen van de hoeveelheid fosfor bevattende bestanddelen in een eetbare olie volgens de uitvinding de eetbare olie bij voorkeur sojaolie, zonnebloemzaadolie, of meer in het bijzonder een raapzaadolie.

Karakterisering van fosfolipase, verkregen van *Fusarium oxysporum*

- [0129] Een fosfolipase volgens de uitvinding, verkregen van *Fusarium oxysporum*, is intensief gekarakteriseerd.
- [0130] Dienovereenkomstig is een aspect van de uitvinding bij voorkeur een geïsoleerd fosfolipase A dat verkregen is van een stam van het geslacht *Fusarium* en

- dat fosfolipase A-activiteit bezit in het pH-gebied van 3-10, gemeten bij 40°C, met meer voorkeur met fosfolipase A-activiteit in het pH-gebied van 3-7, gemeten bij 40°C, met meer voorkeur met fosfolipase A-activiteit in het pH-gebied van 3,5-6, gemeten bij 40°C, en met zelfs meer voorkeur met een fosfolipase A-activiteit in het pH-gebied van 4,5-5,5, gemeten bij 40°C.

- [0131] De fosfolipase A-activiteit werd bepaald met sojaboonlecithine als substraat (NEFA testbasisbepaling), of in een buffer, omvattende 2% Lecithine, 2% Triton X-100, 20 mM Britton-Robinson (BR). Zie de werkvoorbeelden hierin voor verdere details.
- 10 [0132] Volgens een andere uitvoeringsvorm van de uitvinding is een geïsoleerd fosfolipase A, dat verkregen is van een stam van het geslacht *Fusarium*, bij voorkeur een fosfolipase met een molecuulmassa van 29 ± 10 kDa, met meer voorkeur een molecuulmassa van 29 ± 5 kDa met zelfs meer voorkeur een molecuulmassa van 29 ± 3 kDa en met de meeste voorkeur een molecuulmassa van 29 ± 2 kDa.
- 15 [0133] De molecuulmassa wordt gemeten door middel van SDS-PAGE elektroforese, zoals verder beschreven is in de "Materialen en Methoden"- sectie (zie hierna).
- [0134] Volgens een andere uitvoeringsvorm van de uitvinding is een geïsoleerd fosfolipase A dat verkregen is van een stam van het geslacht *Fusarium*, bij voorkeur een fosfolipase dat een iso-elektrische punt (pI) in het gebied van 5,5,-7,5 heeft.
- 20 [0135] Het iso-elektrische punt (pI) werd bepaald onder gebruikmaking van Ampholine PAGE platen van Pharmacia. Zie het werkvoorbeeld hierin voor nadere bijzonderheden (zie hierna).
- [0136] Volgens een andere uitvoeringsvorm van de uitvinding is een geïsoleerd fosfolipase "A", dat verkregen is van een stam van het geslacht *Fusarium* bij voorkeur een fosfolipase dat een temperatuuroptimum voor fosfolipase-activiteit bezit in het gebied tussen 25-55°C, gemeten met lecithine als substraat met een pH van 5; met meer voorkeur in het gebied 30-50°C, gemeten met lecithine als een substraat met een pH van 5, en met zelfs voorkeur in het gebied van 40-50°C, gemeten met lecithine als een substraat met een pH van 5.
- 25 30 [0137] Het temperatuuroptimum voor fosfolipase-activiteit werd gemeten in een buffer, omvattende 2% lecithine, 2% Triton X-100, 20 mM Britton-Robinson, bij een pH van 5. Zie de werkvoorbeelden hierin voor verdere details (zie hierna).

[0138] Volgens een andere uitvoeringsvorm van de uitvinding is een geïsoleerd fosfolipase A dat is verkregen van een stam van het geslacht *Fusarium*, bij voorkeur een fosfolipase dat een pH-optimum voor fosfolipase-activiteit bezit in het pH-gebied van 6-12, bij 37°C; met meer voorkeur in het pH-gebied van 7-11,5, bij 37°C; met
 5 meer voorkeur in het pH-gebied van 8-11, bij 37°C; en met zelfs meer voorkeur in het pH-gebied van 8,5-11, bij 37°C.

[0139] Het pH-optimum voor fosfolipase-activiteit werd bepaald in een buffer omvattende 2% lecithine, 2% Triton X-100, 20 mM Britton-Robinson (BR), bij 37°C. Zie de werkvoorbeelden hierin voor verdere details (zie hierna).

10 [0140] Bij voorkeur omvat een fosfolipase volgens de uitvinding ten minste twee van de vijf (genummerd i) tot v)) van de hierboven vermeldde fysische kenmerken van het enzym, met meer voorkeur omvat een fosfolipase volgens de uitvinding tenminste drie van de vijf (genummerd i) tot v)) van de hierboven vermeldde fysische kenmerken van het enzym, en met zelfs meer voorkeur een fosfolipase volgens de uitvinding ten
 15 minste vier van de vijf (genummerd i) tot v)) van de hierboven vermelde fysische kenmerken van het enzym, en met de meeste voorkeur omvat een fosfolipase volgens de uitvinding alle vijf (genummerd i) tot v)) van de hierboven vermelde fysische kenmerken van het enzym.

[0141] Zoals hierboven is beschreven, is een fosfolipase volgens de uitvinding
 20 gekloneerd, op recombinante wijze tot expressie gebracht, gezuiverd, en zijn de N-eindstandige en C-eindstandige sequenties van het actief uitgescheiden enzym bepaald.

[0142] Dienovereenkomstig heeft een andere uitvoeringsvorm van de uitvinding betrekking op een geïsoleerd polypeptide met fosfolipase A-activiteit welk polypeptide is verkregen van een stam van het geslacht *Fusarium* en heeft:

25

- i) PLA-activiteit in pH-gebied van 3-10, gemeten bij 0°C;
- ii) een moleculaire massa van 29 ± 10 kDa, zoals bepaald door SDS-PAGE;
- iii) een iso-elektrisch punt (pI) in het gebied van 4,5-8;
- iv) een temperatuuroptimum voor de fosfolipase-activiteit in het gebied van 25-
 30 55°C, gemeten met lecithine als substraat bij een pH van 5, en/of
- v) een fosfolipase-activiteit pH-optimum in het pH-gebied van 6-12; gemeten met lecithine als substraat bij 37°C;

en omvat verder een aminozuursequentie gekozen uit de groep bestaande uit:

- (a) een polypeptide dat wordt gecodeerd door het voor fosfolipase-A-enzym coderende deel van de DNA-sequentie, gekloneerd in plasmide pYES 2.0, aanwezig in *Escherichia coli* DSM 11299;
- (b) een polypeptide, met een aminozuursequentie zoals getoond in posities 31-346 van SEQ ID nr. 2;
- (c) een polypeptide met een aminozuursequentie zoals getoond in posities 31-303 van SEQ ID nr. 2;
- (d) een analoog van het polypeptide zoals gedefinieerd in (a), (b), of (c), welke ten minste 70% homoloog met het polypeptide is; en
- (e) een fragment van (a), (b), (c), of (d).

[0143] Volgens een uitvoeringsvorm van de uitvinding is het geïsoleerde polypeptide met fosfolipase-activiteit volgens de uitvinding fosfolipase met fosfolipase A1-activiteit.

[0144] Volgens een andere uitvoeringsvorm is het geïsoleerde polypeptide met fosfolipase-activiteit volgens de uitvinding fosfolipase met een fosfolipase A2-activiteit en in zelfs nog een andere uitvoeringsvorm is het geïsoleerde polypeptide met fosfolipase-activiteit volgens de uitvinding een fosfolipase met fosfolipase B-activiteit.

[0145] Bij voorkeur is het geïsoleerde polypeptide met fosfolipase-activiteit volgens de uitvinding fosfolipase met fosfolipase A1-activiteit.

[0146] Voor specifieke voorbeelden van standaardtechnieken voor het meten van afzonderlijke PLA1, PLA2 en/of PLB activiteit wordt verwezen naar de werkvoorbeelden hierin.

[0147] Volgens een andere uitvoeringsvorm heeft de uitvinding betrekking op een geïsoleerd polypeptide met fosfolipase-activiteit volgens de uitvinding, waarbij het fosfolipase een fosfolipase is dat in hoofdzaak onafhankelijk van Ca^{2+} -concentratie is, gemeten als relatieve fosfolipase-activiteit bij 5 mM EDTA en 5 mM Ca^{2+} in een bepaling van fosfolipase-activiteit waarbij de afgifte wordt gemeten van vrije vetzuren van lecithine in een buffer, omvattende 2% lecithine, 2% Triton X-100, 20 mM citraat, pH 5; 10 minuten geïncubeerd bij 37°C, gevolgd door het 5 minuten stoppen van de reactie bij 95°C; waarbij de verhouding van de relatieve fosfolipase-activiteit bij 5 mM

EDTA Ca^{2+} groter is dan 0,25 met meer voorkeur groter dan 0,5 en met de meeste voorkeur groter dan 0,80.

[0148] Voor nadere bijzonderheden betreffende de meting van de afhankelijkheid van de enzymactiviteit van de Ca^{2+} -concentratie wordt naar de werkvoorbeelden hierin verwezen.

[0149] Sommige lipasen bezitten beperkte fosfolipase-activiteit. In de onderhavige context wordt een dergelijke beperking van de fosfolipase-activiteit van de lipasen gedefinieerd als "een lipase met fosfolipase-nevenactiviteit" (zie sectie "definities" hierin). De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een geïsoleerd polypeptide met fosfolipase-activiteit, waarbij de fosfolipase-activiteit van het geïsoleerde polypeptide zo hoog is dat het van industrieel belang is.

[0150] Dienovereenkomstig heeft de uitvinding betrekking op een geïsoleerd polypeptide met fosfolipase-activiteit volgens de uitvinding, waarbij het fosfolipase een fosfolipase is met een fosfolipase-activiteit die ten minste 0,25 nmol/min, enzymdosering: 60 μg , bij 25°C, met meer voorkeur ten minste 0,40 nmol/min, enzymdosering: 60 μg bij 25°C; als volgt gemeten in een bepaling van een monolaagfosfolipase:

- a. in een monolaaguitrusting (volledig nulde orde) wordt op een grondig gezuiverd oppervlak van een bufferoplossing (10 mM TRIS, pH 8,0, 25°C) een monolaag van het fosfolipide DDPC (Di Dicanoyl (C10) Fosfatidyl Choline) van een chloroformoplossing verspreid;
- b. na relaxatie van de monolaag (afdamping van chloroform), wordt de oppervlaktedruk ingesteld op 15 mN/m, overeenkomend met een gemiddeld molecuulair gebied van DDPC van ongeveer 63 Å²/molecuul;
- c. een bufferoplossing (zoals hierboven) die 60 μg enzym bevat, wordt door de monolaag in de subfase van het reactiecompartiment (cilinder met een gebied van 1520 mm² en een volume van 30400 mm³) in de "volledig nulde orde" geïnjecteerd;
- d. enzymatische activiteit wordt bepaald door de snelheid van een mobiele barrière die de monolaag samendrukt teneinde constante oppervlaktedruk te behouden als niet-oplosbare substraatmoleculen worden gehydrolyseerd tot meer in water oplosbare reactieproducten, waarbij het aantal DDPC-moleculen dat per minuut door

het enzym wordt gehydrolyseerd, wordt berekend aan de hand van het gemiddelde molecuulgebied (MMA) van DDPC.

[0151] Zie de sectie "definities" en de werkvoorbeelden hierin voor verdere
5 beschrijvingen van de voorkeursoeveheden van fosfolipase-activiteiten voor een
geïsoleerd polypeptide met fosfolipase-activiteit volgens de uitvinding.

[0152] Verder kan de specifieke fosfolipase-activiteit van een fosfolipase volgens
de uitvinding worden gemeten d.m.v. standaard bepalingen van fosfolipase-activiteit.

[0153] Dienovereenkomstig heeft in een andere uitvoeringsvorm de onderhavige
10 uitvinding betrekking op een geïsoleerd polypeptide met fosfolipase-activiteit volgens
de uitvinding, waarbij het fosfolipase een fosfolipase is dat een fosfolipase-activiteit
bezit die in staat is ten minste 7 μmol vrij vetzuur/min./mg enzym vrij te maken; met
meer voorkeur ten minste 15 μmol vrij vetzuur/min./mg enzym; met zelfs meer
voorkeur ten minste 30 μmol vrij vetzuur/min./mg enzym en met de meeste voorkeur
15 ten minste 50 μmol vrij vetzuur/min./mg enzym, op de volgende wijze:

de fosfolipase-activiteit wordt gemeten in een bepaling die de vrijmaking meet van
vrije vetzuren uit lecithine in een buffer, omvattende 2% lecithine, 2% Triton X-100,
20 mM citraat, pH 5; 10 minuten geïncubeerd bij 37°C, gevolgd door het 5 minuten
20 stoppen van de reactie bij 95°C.

[0154] Voor nadere bijzonderheden met betrekking tot deze uitvoeringsvorm van
de uitvinding wordt naar de werkvoorbeelden hierin verwezen.

[0155] Een geïsoleerd polypeptide met fosfolipase-activiteit volgens de uitvinding
25 is zeer geschikt voor het uitvoeren van enzymatische ontgomming van een eetbare olie.

[0156] Dienovereenkomstig heeft de uitvinding betrekking op:

1. een geïsoleerd polypeptide met fosfolipase-activiteit volgens de uitvinding,
waarbij het fosfolipase in staat is enzymatische ontgomming van een eetbare olie uit
30 te voeren, volgens een werkwijze van de uitvinding, teneinde de hoeveelheid fosfor
bevattende bestanddelen in een eetbare olie, omvattende een gehalte niet-
hydrateerbare fosfor van minder dan 50 ppm, te verminderen; en

2. een geïsoleerd polypeptide met fosfolipase-activiteit volgens de uitvinding waarbij het fosfolipase in staat is enzymatische ontgomming van een met water ontgomde eetbare olie uit te voeren, (met een fosforgehalte van 50-250 ppm), waardoor het fosforgehalte van de olie tot minder dan 11 ppm wordt verminderd, 5 waarbij enzymatische ontgommingswerkwijze het in contact brengen van de olie, bij een pH van 1.5-8, met een waterige oplossing van het fosfolipase, dat in de olie wordt geëmulgeerd totdat het fosforgehalte van de olie verminderd is tot minder dan 11 ppm, en vervolgens de waterfase van de behandelde olie te verwijderen.

10 [0157] Bij voorkeur is het geïsoleerde polypeptide met fosfolipase-activiteit volgens de uitvinding in staat de enzymatische ontgommingswerkwijze van de met water ontgomde eetbare olie (onmiddellijk hierboven gedefinieerd) in minder dan 1,5 uur uit te voeren en gebruikt minder dan 2 mg fosfolipase (droge stof) kg/olie.

[0158] Bij voorkeur wordt een geïsoleerd polypeptide volgens de uitvinding dat 15 fosfolipase-activiteit bezit en de hierboven vermeldde kenmerken bezit, verkregen van een draadvormige schimmelstam behorend tot het geslacht van *Fusarium*.

[0159] Echter, zonder door enige theorie te zijn gebonden, wordt beoogd dat een fosfolipase volgens de uitvinding eveneens kan worden verkregen van een ander micro-organisme, bij voorkeur een andere draadvormige schimmelstam. Voorbeelden daarvan 20 worden gegeven in de sectie "microbiële bronnen" (zie hierna)

Gekloneerde DNA-sequentie

[0160] Ondanks een aantal technische moeilijkheden (zie sectie "Werkwijze voor 25 klonering van een draadvormig schimmelfosfolipase", zie hierna) zijn de onderhavige uitvinders in staat geweest een fosfolipase te kloneren dat PLA-activiteit bezit, van een stam van het geslacht *Fusarium*, meer in het bijzonder *Fusarium oxysporum*.

[0161] Verder wordt thans aangenomen dat het mogelijk is een DNA-sequentie te kloneren die zowel voor een verwant fosfolipase A en/of fosfolipase B codeert, 30 gebaseerd op de sequentie-informatie die in de onderhavige aanvragen wordt verschaft.

[0162] Dienovereenkomstig heeft een aspect van de uitvinding betrekking op een gekloneerde DNA-sequentie die voor een enzym codeert dat fosfolipase A- en/of

fosfolipase B-activiteit bezit, welke DNA-sequentie is gekozen uit de groep
omvattende :

- 5 (a) het voor fosfolipase A coderendē deelt van het polynucleotide dat gekloneerd is in plasmide pYES 2.0, dat aanwezig is in *Escherichia coli* DSM 11299;
- (b) de DNA-sequenties getoond in posities 23-1063 in SEQ ID nr. 1, met meer voorkeur posities 113-1063 in SEQ ID nr. 1, of met zelfs meer voorkeur posities 113-929 in SEQ ID nr. 1, of de complementaire streng ervan;
- 10 (c) een DNA-sequentie die ten minste 70% homolog is met de DNA-sequentie die in (a) of (b) is gedefinieerd;
- (d) een in (a) of (b) gedefinieerde DNA-sequentie, die codeert voor een polypeptide dat fosfolipase-activiteit bezit en tenminste 70% homolog is met de polypeptidesequentie die wordt getoond in posities 31-303 van sequentie SEQ ID nr.2;
- 15 (e) een DNA-sequentie die met lage strengheid hybridiseert met een dubbelstrengse DNA-probe, omvattende de in posities 23-1063 in SEQ ID nr.1 getoonde DNA-sequentie;
- (f) een DNA-sequentie die codeert voor een polypeptide met de aminozuursequenties van de resten 1 tot 346, 31 tot 346, of 31 tot 303 van SEQ ID
- 20 nr. 2, of de aminozuursequenties die worden gecodeerd door één van de DNA-sequenties van (e); en
- (g) een DNA-sequentie, welke een deel is van de DNA-sequenties zoals gespecificeerd in (a), (b), (c), (d), (e), of (f).
- 25 **[0163]** Telkens als in deze specificatie wordt verwezen naar het voor fosfolipase coderende gedeelte van de DNA-sequentie die is gekloneerd in plasmide pYES 2.0 die aanwezig is in DSM 11299, wordt met een dergelijke verwijzing eveneens bedoeld dat deze het voor fosfolipase coderende gedeelte van de DNA-sequentie omvat die in SEQ ID nr.1 wordt weergegeven.
- 30 **[0164]** Dienovereenkomstig kunnen de uitdrukkingen "het voor fosfolipase coderende gedeelte van de DNA-sequentie die gekloneerd is in plasmide pYES 2.0, aanwezig in DSM 11299" en "het voor fosfolipase coderende gedeelte van de DNA-

sequentie die in SEQ ID nr. 1 wordt weergegeven" onderling verwisselbaar worden gebruikt.

[0165] De DNA-sequentie kan van genomische oorsprong, cDNA-oorsprong of synthetische oorsprong of van enige combinatie daarvan zijn.

5 [0166] De onderhavige uitvinding omvat eveneens een gekloneerde DNA-sequentie die codeert voor een enzym dat fosfolipase A- en/of fosfolipase B-activiteit bezit waarbij de aminozuursequentie is vermeldt als het volwaardige gedeelte van SEQ ID nr.2, die van SEQ ID nr.1 verschilt vanwege de degeneratie van de genetische code.

10 [0167] De in SEQ ID nr.1 getoonde DNA-sequentie en/of een analoge DNA-sequentie volgens de uitvinding kan worden gekloneerd van een stam van de draadvormige schimmel *Fusarium oxysporum* die het enzym met fosfolipase-activiteit vormt, of een ander of verwant organisme zoals hierna verder is beschreven (zie sectie "Microbiële bronnen").

15 [0168] Als alternatief kan de analoge sequentie worden geconstrueerd op basis van de DNA-sequentie, weergegeven als het voor fosfolipase coderende gedeelte van SEQ ID nr.1, b.v. die een subsequentie daarvan is, en/of wordt geconstrueerd door het inbrengen van nucleotidesubstituties die geen andere aminozuursequentie geven van het fosfolipase dat door de DNA-sequentie wordt gecodeerd, maar overeenkomt met het codongebruik van het gastheerorganisme dat wordt beoogd voor de productie van
20 het enzym, of door het inbrengen van nucleotidesubstituties die een andere aminozuursequentie (d.w.z. een variant van het fosfolipase volgens de uitvinding) geven.

[0169] Bij het uitvoeren van nucleotidesubstituties zijn de aminozuurveranderingen bij voorkeur van een ondergeschikte aard, d.w.z.
25 conserverende aminozuursubstituties die de opvouwing of de activiteit van het eiwit niet aanzienlijk beïnvloeden; kleine deleties, gewoonlijk van 1 tot ongeveer 30 aminozuren; kleine amino- of carboxyl -eindstandige verlengingen, zoals een amino-eindstandig methionine; een klein bindingspeptide van tot ongeveer 20-25 resten; of een kleine verlenging die zuivering vergemakkelijkt, zoals een poly-histidinetraject;
30 een antigene epitoom of een bindingsdomein.

[0170] Voorbeelden van conserverende substituties zijn binnen de groep van basische aminozuren, zoals arginine, lysine, histidine; zure aminozuren, zoals glutaminezuur en asparaginezuur; polaire aminozuren, zoals glutamine en asparagine;

hydrofobe aminozuren, zoals leucine, isoleucine, valine; aromatische zuren, zoals fenylalanine, tryptofaan, tyrosine; en kleine aminozuren, zoals glycine, alanine, serine, threonine, methionine. Voor een algemene beschrijving van nucleotidesubstitutie, zie b.v. Ford et al. (1991), *Protein Expression and Purification* 2, 95-107.

- 5 [0171] Het zal aan de deskundigen op dit gebied duidelijk zijn dat dergelijke substituties kunnen worden uitgevoerd buiten de gebieden die van doorslaggevend belang zijn voor de functie van het molecuul en nog steeds een actief polypeptide tot gevolg hebben. Aminozuren die essentieel zijn voor de activiteit van het polypeptide dat door de gekloneerde DNA-sequentie volgens de uitvinding wordt gecodeerd en
- 10 daarom bij voorkeur niet aan substitutie worden onderworpen, kunnen worden geïdentificeerd volgens werkwijzen die in de stand van de techniek bekend zijn, zoals plaatsgerichte mutagenese of alanine-scanning mutagenese (zie b.v. Cunningham en Wells (1989), *Science* 244, 1081-1085). Bij de laatste techniek worden mutaties op elke rest in het molecuul ingebracht, en de verkregen mutantmoleculen worden op
- 15 biologische (d.w.z. fosfolipase) activiteit getest om aminozuurresten te identificeren die van doorslaggevend belang zijn voor de activiteit van het molecuul. Plaatsen van substraatenzyminteractie kunnen eveneens worden bepaald d.m.v. analyse van de kristalstructuur, zoals wordt bepaald door middel van technieken zoals analyse met kernmagnetische resonantie, kristallografie of merken op basis van foto-affiniteit (zie
- 20 b.v. De Vos et al. (1992), *Science* 255, 306-312; Smith et al. (1992), *J. Mol. Biol.* 224, 899-904; Wlodaver et al. (1992), *FEBS Lett.* 309, 59-64).

- [0172] Polypeptiden volgens de onderhavige uitvinding omvatten eveneens gefuseerde polypeptiden of splitsbare fusiepolypeptiden, waarin een ander polypeptide op het N-uiteinde of het C-uiteinde van het polypeptide of een fragment daarvan is
- 25 gefuseerd. Een gefuseerd polypeptide wordt gevormd door het fuseren van een nucleïnezuursequentie (of een gedeelte daarvan) die voor een ander polypeptide codeert, met een nucleïnezuursequentie (of een gedeelte daarvan) volgens de onderhavige uitvinding. Technieken voor het verschaffen van gefuseerde polypeptiden zijn in de stand van de techniek bekend en deze omvatten het zodanig ligeren van de
- 30 coderende sequenties die voor de polypeptiden coderen dat deze zich binnen het raamwerk bevinden en zodanig dat de expressie van het gefuseerde polypeptide onder de regeling van dezelfde promotor (s) en beëindiger staat.

[0173] De DNA-sequentie volgens de uitvinding kan worden gekloneerd van de stam van *Escherichia coli* DSM Nr. 11299 onder gebruikmaking van standaard kloneringstechnieken, b.v. zoals beschreven is door Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab.; Cold Spring Harbor, NY.

5 [0174] Doordat de onderhavige uitvinders het probleem van het ontwikkelen van een geschikte screeningsbepaling voor gebruik bij een techniek van expressiekloning voor het kloneren van een fosfolipase volgens de uitvinding hebben opgelost, zie de sectie met de titel "Werkwijze voor het kloneren van een draadvormig schimmelfosfolipase" kan de DNA-sequentie volgens de uitvinding nu worden
10 gekloneerd volgens elke algemene werkwijze, omvattende

- het kloneren, in geschikte vectoren, van een cDNA-bank van één of ander organisme waarvan wordt verwacht dat dit het van belang zijnde fosfolipase produceert,
- 15 • het transformeren van geschikte gastgastheercellen met deze vectoren,
- het kweken van de gastheercellen onder geschikte omstandigheden om één of ander enzym dat van belang is, dat wordt gecodeerd door een kloon in de cDNA-bank, tot expressie te brengen,
- het screenen op positieve klonen door het bepalen van elke fosfolipase-activiteit
20 van het enzym dat door dergelijke klonen wordt gevormd, en
- het isoleren van het DNA dat voor het enzym codeert, uit dergelijke klonen.

[0175] Als alternatief kan het DNA dat voor een fosfolipase volgens de uitvinding codeert, doordat de onderhavige uitvinding voor de eerste keer een gekloneerde DNA-
25 sequentie verschaft die voor een draadvormig schimmel-PLA-enzym codeert, volgens algemeen bekende werkwijzen gemakkelijk uit een geschikte bron, zoals één van de organismen die in de sectie "Microbiële Bronnen" wordt vermeld, worden gekloneerd door gebruik te maken van synthetische oligonucleotideprobes die zijn bereid op basis van een hierin beschreven DNA-sequentie. Een geschikte oligonucleotideprobe kan
30 bijvoorbeeld worden bereid op basis van het voor fosfolipase coderende gedeelte van de nucleotidesequenties die zijn weergegeven als SEQ ID nr.1 of van één of andere geschikte subsequentie daarvan, of op basis van de aminozuursequentie SEQ ID nr.2.

[0176] Doordat een gekloneerde DNA-sequentie volgens de uitvinding voor een polypeptide met fosfolipase-activiteit volgens de uitvinding codeert, zijn verder een aantal van de specifieke uitvoeringsvormen die betrekking hebben op een geïsoleerd polypeptide met fosfolipase-activiteit volgens de uitvinding eveneens
 5 uitvoeringsvormen van de uitvinding voor een gekloneerde DNA-sequentie volgens de uitvinding die codeert voor een polypeptide met fosfolipase-activiteit. Dientengevolge hebben referenties en uitvoeringsvormen van het geïsoleerde polypeptide met fosfolipase-activiteit die de voorkeur of de meeste voorkeur hebben, eveneens betrekking op een gekloneerde DNA-sequentie volgens de uitvinding.

10 [0177] Dienovereenkomstig heeft een uitvoeringsvorm van de uitvinding betrekking op een gekloneerde DNA-sequentie volgens de uitvinding, waarbij het fosfolipase dat door de DNA-sequentie wordt gecodeerd een fosfolipase A1 is.

[0178] In een andere uitvoeringsvorm is een gekloneerde sequentie volgens de uitvinding een gekloneerde DNA-sequentie waarbij het fosfolipase dat door de DNA-
 15 sequentie wordt gecodeerd een fosfolipase A2 is, en in zelfs nog een andere uitvoeringsvorm is een gekloneerde sequentie volgens de uitvinding een gekloneerde DNA-sequentie, waarbij het fosfolipase dat door de DNA-sequentie wordt gecodeerd, een fosfolipase B is.

[0179] Bij voorkeur codeert de gekloneerde DNA-sequentie volgens de uitvinding
 20 voor een polypeptide met een fosfolipase A1-activiteit.

[0180] Verder heeft de uitvinding betrekking op een gekloneerde DNA-sequentie volgens de uitvinding, waarbij het fosfolipase dat door de DNA-sequentie wordt gecodeerd een fosfolipase is dat in hoofdzaak onafhankelijk is van de Ca^{2+} -concentratie, gemeten als:

25 relatieve fosfolipase-activiteit bij 5 mM EDTA en 5 mM Ca^{2+} in een bepaling van fosfolipase-activiteit die de vrijmaking meet van vrije vetzuren uit lecithine in een buffer, omvattende 2% lecithine, 2% Triton X-100, 20 mM citraat, pH 5; 10 min. bij 37°C geïncubeerd, gevolgd door het 5 min. stoppen van de reactie bij 95°C;

30 waarbij de verhouding van relatieve fosfolipase-activiteit bij 5 mM EDTA/5 mM Ca^{2+} een verhouding is die groter is dan 0,25, met meer voorkeur een verhouding die groter is dan 0,5.

[0181] De uitvinding heeft zelfs verder betrekking op een gekloneerde DNA-sequentie volgens de uitvinding waarbij het fosfolipase dat door de DNA-sequentie wordt gecodeerd, een fosfolipase is met een fosfolipase-activiteit die tenminste 0,25 nmol/min. is, enzymdosering: 60 µg, bij 25°C; met meer voorkeur ten minste 0,40 nmol/min, enzymdosering: 60 µg, bij 25°C; als volgt gemeten in een monolaag-fosfolipasebepaling:

- a. in een monolaaguitrusting (volledig nulde orde) wordt op een grondig gezuiverd oppervlak van een bufferoplossing (10mM TRIS, pH 8,0 25°C) een monolaag van de fosfolipide DDPC (Di Dicanoyl (C10) Fosfatidyl Choline) van een chloroform oplossing verspreid;
- b. na relaxatie van de monolaag (afdamping van chloroform), wordt de oppervlaktedruk ingesteld op 15 mN/m, overeenkomend met een gemiddeld moleculair gebied van DDPC van ongeveer 63 Å²/molecuul;
- c. een bufferoplossing (zoals hierboven) die 60 µg enzym bevat, wordt door de monolaag in de subfase van het reactiecompartiment (cilinder met een gebied van 1520 mm² en een volume van 30400 mm³) in de "volledige nulde orde" geïnjecteerd;
- d. enzymatische activiteit wordt bepaald door de snelheid van een mobiele barrière die de monolaag samendrukt teneinde constante oppervlaktedruk te behouden als niet-oplosbare substraatmoleculen worden gehydrolyseerd tot meer in water oplosbare reactieproducten, waarbij het aantal DDPC-moleculen dat per minuut door het enzym wordt gehydrolyseerd, wordt berekend aan de hand van het gemiddelde molecuulgebied (MMA) van DDPC.

25

[0182] Volgens een andere uitvoeringsvorm heeft de uitvinding betrekking op een gekloneerde DNA-sequentie volgens de uitvinding, waarbij het fosfolipase dat door de DNA-sequentie wordt gecodeerd een fosfolipase is met een fosfolipase-activiteit die in staat is ten minste 7µmol vrij vetzuur/min./mg enzym vrij te maken; met meer voorkeur ten minste 15 µmol vrij vetzuur/min./mg enzym; als volgt gemeten:

30

fosfolipase-activiteit wordt gemeten in een bepaling die het vrijmaken van vrije vetzuren van lecithine meet in een buffer, omvattende 2% lecithine, 2% Triton X-

100, 20 mM citraat, pH 5; 10 min. bij 37°C geïncubeerd, gevolgd door het 5 minuten stoppen van de reactie bij 95°C.

[0183] In andere uitvoeringsvormen heeft de uitvinding betrekking op:

5

een gekloneerde DNA-sequentie volgens de uitvinding, waarbij het fosfolipase dat door de DNA-sequentie wordt gecodeerd, in staat is enzymatische ontgomming van een eetbare olie uit te voeren volgens een werkwijze van de uitvinding, teneinde de hoeveelheid fosfor bevattende bestanddelen in een eetbare olie die een gehalte niet-hydrateerbare fosfor van ten minste 50 ppm omvat; te verminderen en

10

een gekloneerde DNA-sequentie volgens de uitvinding, waarbij het fosfolipase dat door de genoemde DNA-sequentie wordt gecodeerd, in staat is een enzymatische ontgomming uit te voeren van een met water-ontgomde eetbare olie (die een fosforgehalte van 50-250 ppm heeft) en daardoor het fosforgehalte van de olie tot minder dan 11 ppm te verminderen, waarbij de enzymatische ontgommingswerkwijze het in contact brengen van de olie met een pH van 1,5-8 met een waterige oplossing van het fosfolipase dat in de olie wordt geëmulgeerd totdat het fosforgehalte van de olie is verminderd tot minder dan 11 ppm, en vervolgens het scheiden van de waterige fase van de behandelde olie omvat..

20

[0184] Bij voorkeur is een gekloneerde DNA-sequentie volgens de uitvinding een gekloneerde DNA-sequentie waarbij het fosfolipase dat door de DNA-sequentie wordt gecodeerd, in staat is de enzymatische ontgommingswerkwijze van de met water ontgomde eetbare olie uit te voeren onder gebruikmaking van minder dan 2 mg fosfolipase (droge stof)/kg olie, en waarbij het fosfolipase 15 minuten tot 2 uur met de olie in contact is.

25

Werkwijze voor het kloneren van een draadvormig schimmelfosfolipase

30 [0185] Een aantal technische moeilijkheden werd ondervonden bij het pogen een fosfolipase volgens de uitvinding te isoleren of een polypeptide dat daarvoor codeerde, te kloneren. Het bleek onmogelijk het enzym te isoleren en het probleem van het kloneren van het polypeptide werd verder onderzocht.

[0186] Zoals hierin is beschreven was geen eerdere DNA-sequentie die voor draadvormig schimmelfosfolipase A codeert, beschikbaar. Dientengevolge ontwikkelde de onderhavige uitvinders een kloneringswerkwijze die was gebaseerd op de expressieklonering in gisttechniek (H. Dalboege et al., Mol. Gen. Genet (1994), 243:253-260; WO 93/11249; en WO 94/14953).

[0187] Eén van de belangrijkste problemen die men bij deze techniek ondervond, was, dat gist een inwendige activiteit vormt waardoor op plaatbepalingen een fosfolipase-achtergrond wordt gevormd. Deze achtergrond bleek sterk afhankelijk te zijn van de hoeveelheid substraat in de bepalingenplaten, en de hoeveelheid substraat moest derhalve zorgvuldig worden getitreerd tot een niveau waarbij de achtergrond voor de bepaling laag genoeg was om deze betrouwbaar te maken tijdens de screeningswerkwijze met expressieklonering, maar hoog genoeg om de reactie te laten plaatsvinden.

[0188] Verder omvatten draadvormige schimmelstammen over het algemeen een aantal verschillende lipasen waarvan sommige zelfs beperkte fosfolipase-activiteit vertoonden. Dergelijke lipasen worden hierin gedefinieerd als "een lipase met fosfolipase-nevenactiviteit" (zie de sectie "Definities" hierin).

[0189] In de plaatbepaling bleek de achtergrond van dergelijke lipasen met fosfolipase-nevenactiviteit eveneens zeer afhankelijk te zijn van de hoeveelheid substraat in de bepalingenplaten, en de hoeveelheid substraat moest derhalve zelfs nog zorgvuldiger worden getitreerd teneinde de achtergrondactiviteit van zowel de gistcellen als de draadvormige schimmellipasen met fosfolipase-nevenactiviteit te elimineren.

[0190] Bovendien werd vastgesteld dat een zorgvuldige selectie van het substraat moest worden uitgevoerd, aangezien veel ervan geen enkele functionele oplossing van dit probleem verschaffen, doordat een aantal van de geteste fosfolipase-substraten een achtergrond activiteit gaven doordat lipasen, zonder fosfolipase-activiteit, in staat waren op de substraten te reageren. Dienovereenkomstig moest een groot aantal substraten worden getest en getitreerd teneinde een geschikt substraat te identificeren.

[0191] De oplossing die werd gevonden om het mogelijk te maken de expressieklonering van een polynucleotide dat voor een fosfolipase codeert, uit te voeren, was het gebruik van Lipoid E80 (van Lipoid GmbH) in zorgvuldig geregelde concentraties. In de sectie Materialen en Werkwijzen hierin wordt een gedetailleerde

beschrijving van de volledige expressieklonering in de gistwerkwijze beschreven, met inbegrip van een plaatbepaling die de hierboven beschreven problemen oplost.

Homologie/gelijkheid van DNA-sequenties

5

[0192] De hierboven vermelde DNA-sequentiehomologie/gelijkheid wordt bepaald als de mate van gelijkheid tussen twee sequenties die een afwijking van de eerste sequentie ten opzichte van de tweede aangeven. De homologie kan op een geschikte wijze worden bepaald d.m.v. in de stand van de techniek bekende computerprogramma's, zoals GAP dat in het GCG-programmapakket wordt verschaft (Program Manual for the Wisconsin Package, versie 8, augustus 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B. en Wunsch, C.D. (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453).). Onder gebruikmaking van GAP met de volgende instellingen voor DNA-sequentievergelijking: bij het GAP-vormingsnadeel van 5,0 en de GAP-verlengingsnadeel van 0,3 vertoont het coderingsgebied van de DNA-sequentie een mate van gelijkheid van bij voorkeur ten minste 70%, met meer voorkeur ten minste 80%, met meer voorkeur ten minste 90%, met meer voorkeur ten minste 95%, met meer voorkeur tenminste 97%, met het voor fosfolipase coderende gedeelte van de DNA-sequentie die wordt getoond in SEQ ID nr.1 (d.w.z. positie 23-1063 in SEQ ID nr.1); of met meer voorkeur met de DNA-sequentie die wordt getoond in positie 113-1063 in SEQ ID nr.1 (pos.113 komt overeen met de N-eindstandige rest van het volwaardige enzym); of met meer voorkeur met de DNA-sequentie die wordt getoond in positie 23-929 in SEQ ID nr. 1 (pos. 929 komt overeen met de C-eindstandige rest in het C-eindstandig verwerkte uitgescheiden actieve enzym).

Hybridisatie

[0193] Met de hierboven vermelde hybridisatie wordt beoogd een analoge DNA-sequentie te omvatten die met een dubbelstrengs DNA-probe hybridiseert die overeenkomt met het voor fosfolipase coderende gedeelte van de DNA-sequentie die in SEQ ID nr.1 wordt getoond, d.w.z. nucleotiden 23-1063, of met meer voorkeur hybridiseert met een dubbeltrengige DNA-probe die overeenkomt met de DNA-

sequentie die wordt getoond in positie 113-1063 in SEQ ID nr.1 (pos.113 komt overeen met de N-eindstandige rest van het volwaardige enzym); of met zelfs meer voorkeur hybridiseert met een dubbelstrengs probe die overeenkomt met de DNA-sequentie die wordt getoond in positie 23-929 in SEQ ID nr.1 (pos.929 komt overeen met de C-eindstandige rest in het C-eindstandig verwerkte uitgescheiden actieve enzym), onder ten minste omstandigheden van geringe strengheid, zoals hierna in bijzonderheden is beschreven.

[0194] Geschikte experimentomstandigheden voor het bepalen van de hybridisatie bij geringe, middelmatige of hoge strengheid tussen een nucleotideprobe en een homologe DNA- of RNA-sequentie omvat het vooraf drenken van het filter dat de DNA-fragmenten of het RNA bevat om 10 min. te hybridiseren in 5 x SSC (Natriumchloride/Natriumcitraat, Sambrook et al., 1989), en pre-hybridisatie van het filter in een oplossing van 5 x SSC, 5 x Denhardt's oplossing (Sambrook et al., 1989), 0,5% SDS en 100 µg/ml van gedenateerd aan sonicatie onderworpen zalm-sperma-DNA (Sambrook et al., 1989), gevolgd door 12 uur hybridisatie bij ongeveer 45°C in dezelfde oplossing die 10 ng/ml van een willekeurig geprimeerde (Feinberg, A.P. en Vogelstein, B. (1983) Anal. Biochem. 132:6-13) met een met 32P-dCTP gemerkte (specifieke activiteit > 1x 10⁹ cpm/µg) probe. Het filter wordt vervolgens tweemaal 30 minuten in 2x SSC, 0,5 % SDS gewassen bij een temperatuur van ten minste 55°C (geringe strengheid), met meer voorkeur ten minste 60°C (middelmatige strengheid), met nog meer voorkeur ten minste 65°C (middelmatige/hoge strengheid), met zelfs meer voorkeur ten minste 70°C (hoge strengheid), met zelfs meer voorkeur tenminste 75°C (zeer hoge strengheid).

[0195] Moleculen waaraan de oligonucleotideprobe onder deze omstandigheden hybridiseert worden gedetecteerd onder gebruikmaking van een röntgenfilm.

[0196] Gevonden is dat het mogelijk is theoretisch te voorspellen of twee bepaalde DNA-sequenties al dan niet onder bepaalde omstandigheden zullen hybridiseren.

[0197] Dienovereenkomstig kan als een alternatief voor de hierboven beschreven experimentele werkwijze de bepaling of een analoge DNA-sequentie al dan niet met de hierboven beschreven nucleotide probe zal hybridiseren, worden gebaseerd op een theoretische berekening van de T_m (smelttemperatuur) waarbij twee heterologe DNA-sequenties onder gespecificeerde omstandigheden (b.v. ten aanzien van kationconcentratie en temperatuur) met bekende sequenties zullen hybridiseren.

[0198] Teneinde de smelttemperatuur voor heterologe DNA-sequenties te bepalen (T_m (hetero)) is het noodzakelijk eerst de smelttemperatuur (T_m (homo)) voor homologe DNA-sequentie te bepalen.

[0199] De smelttemperatuur (T_m (homo)) tussen twee volledig complementaire DNA-strengen homoduplexvorming kan worden bepaald door toepassing van de volgende formule:

$$T_m(\text{homo}) = 81,5^\circ\text{C} + 16,6(\log M) + 0,41(\%GC) - 0,61 (\%form) - 500/L$$

10 ("Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995), waarin

"M" de concentratie molaire kation in de wasbuffer aangeeft,

"%GC" % Guanine (G) en Cytosine (C) van het totale aantal basen in de DNA-sequentie,

15 "%form" % formamide in de wasbuffer, en

"L" de lengte van de DNA-sequentie.

[0200] Onder toepassing van deze formule en de hierboven vermelde experimentele wasomstandigheden is de T_m (homo) voor de homoduplexvorming van de nucleotideprobe die overeenkomt met de in SEQ ID nr.1 getoonde DNA-sequentie, d.w.z. nucleotiden 23-1060:

$$T_m(\text{homo}) = 81,5^\circ\text{C} + 16,6(\log 0,30) + 0,41(56) - 0,61 (0) - (500/1038)$$

25 $T_m(\text{homo}) = 103,5^\circ\text{C}.$

"M": 2 X SSC komt overeen met een kationconcentratie van 0,3M.

"%GC" Het % GC in SEQ ID nr. 1, pos. 23-1060 is 56%

"%form": Er is geen formamide in de wasbuffer.

30 "L": De lengte van SEQ ID nr. 1, pos. 23-1063 1038 bp.

[0201] De volgens de hierboven vermelde formule bepaalde T_m is de T_m van een homoduplexvorming (T_m (homo)) tussen twee volledig complementaire DNA-

sequenties. Teneinde de T_m -waarde aan te passen aan die van twee heterologe DNA-sequenties, wordt verondersteld dat een verschil van 1% in de nucleotidesequentie tussen de twee heterologe sequenties gelijk is aan een verlaging van 1°C in T_m ("Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995). Daarvoor
 5 wordt de T_m (hetero) voor de heteroduplexvorming gevonden door het aftrekken van het verschil van het homologie % tussen de analoge sequentie in kwestie en de hierboven beschreven nucleotideprobe van de T_m (homo). Het af te trekken percentage DNA-homologie wordt berekend zoals hierin is beschreven. (zie hierboven)

10 Homologie met aminozuursequenties

[0202] De polypeptidehomologie waarnaar hierboven wordt verwezen wordt bepaald als de mate van gelijkheid tussen twee sequenties die een afwijking van de eerste sequentie ten opzichte van de tweede aangeven. De homologie kan op een
 15 geschikte wijze worden bepaald door middel van in de stand van de techniek bekende computerprogramma's, zoals GAP, dat wordt verschaft in het GCG-programmapakket (Program Manual for the Wisconsin Package, Versie 8, augustus 1994, Genetics Computer Group, 575 science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B. en Wunsche, D.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453. Onder
 20 gebruikmaking van GAP met de volgende instellingen voor polypeptidesequentievergelijking: GAP-vormingsnadeel van 3,0 en GAP-verlengingsnadeel van 0,1 vertoont het volwaardige gedeelte van een polypeptide dat door een analoge DNA-sequentie wordt gecodeerd, een mate van gelijkheid die bij voorkeur ten minste 70% is, met meer voorkeur ten minste 80% is, met meer voorkeur
 25 ten minste 90% is, met meer voorkeur ten minste 95% is en in het bijzonder ten minste 97% is met het volwaardige gedeelte van de aminozuursequentie die wordt getoond in SEQ ID Nr. 2, d.w.z. positie 31-346 in sequentie SEQ ID Nr. 2 of met meer voorkeur met de aminozuursequentie die wordt getoond in positie 31-303 van SEQ ID Nr. 2 (pos. 303 is de C-eindstandige rest in C-eindstandig verwerkt uitgescheiden actief
 30 enzym).

[0203] De onderhavige uitvinding heeft eveneens betrekking op fosfolipasevarianten met een aminozuursequentie die met niet meer dan 3 aminozuren, bij voorkeur niet meer dan 2 aminozuren, en met meer voorkeur met niet meer dan 1

aminozuur verschilt van het volwaardige gedeelte van de in SEQ ID Nr. 2 vermelde aminozuursequentie.

[0204] Verder hebben de hierboven vermelde aminozuurgelijkheden die de voorkeur hebben, eveneens betrekking op een analoog van een gekloneerde DNA-sequentie volgens de uitvinding, welke sequentie voor een polypeptide codeert dat fosfolipase-activiteit bezit en dat ten minste 70% homoloog is met de in posities 31-346 van SEQ ID Nr. 2 getoonde polypeptidesequentie, of met meer voorkeur ten minste 70% homoloog is met de polypeptidesequentie die de posities 31-303 van SEQ ID Nr. 2 omvat.

10

Immunologische kruisactiviteit

[0205] Antilichamen die zullen worden gebruikt bij het bepalen van immunologische kruisreactiviteit, kunnen worden bereid door een gezuiverd fosfolipase te gebruiken. Meer in het bijzonder kan het antiserum tegen het fosfolipase volgens de uitvinding worden opgewekt door het immuniseren van konijnen (of andere knaagdieren) volgens de werkwijze die beschreven is door N. Axelsen et al. in A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Hoofdstuk 23, of A. Johnstone en R. Thorpe, Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, 1982 (meer in het bijzonder blz. 27-31). Gezuiverde immunoglobulinen kunnen worden verkregen van het antiserum dat b.v. verkregen is door zoutprecipitatie $((\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4)$, gevolgd door dialyse en ionenuitwisselingschromatografie, b.v. op DEAE-Sephadex. Immunochemische karakterisering van eiwitten kan worden uitgevoerd ofwel door dubbele diffusie-analyse volgens Outcherlony (O. Outcherlony in: Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir, Ed.), Blackwell Scientific Publications, 1967, blz. 655-706), door gekruiste immuno-elektroforese (N. Axelsen et al., supra, Hoofdstukken 3 en 4) of door raket-immuno-elektroforese (N. Axelsen et al., Hoofdstuk 2).

30 Microbiële bronnen

[0206] Op de prioriteitsdatum van de onderhavige uitvinding is de taxonomie die hierna wordt toegepast, in overeenstemming met de NCBI-taxonmie-browser van het World Wide Web (WWW).

5 [0207] Een geïsoleerd polypeptide met fosfolipase-activiteit en de overeenkomstige gekloneerde DNA-sequentie volgens de uitvinding kunnen van elk willekeurig micro-organisme, bij voorkeur een draadvormige schimmel, een gistcel of een bacterie, worden verkregen.

[0208] Bij voorkeur kan een fosfolipase en de overeenkomstige gekloneerde DNA-sequentie volgens de uitvinding worden verkregen van een draadvormige
10 schimmelstam, waarbij een voorkeursstam *Ascomycota* is, waarbij een voorkeursklasse *Pyrenomycetes* is, omvattende de voorkeursfamilie *Nectriaceae*.

[0209] Met meer voorkeur kunnen het fosfolipase en de overeenkomstige gekloneerde DNA-sequentie volgens de uitvinding worden verkregen van een stam van het geslacht *Fusarium*, zoals een stam van *F. culmorum*, *F. heterosporum* of *F. solani*,
15 in het bijzonder een stam van *Fusarium oxysporum*.

[0210] Verder kunnen een fosfolipase en de overeenkomstige gekloneerde DNA-sequentie volgens de uitvinding worden verkregen van een draadvormige schimmelstam van het geslacht *Aspergillus*, zoals een stam van *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* of in het bijzonder
20 *Aspergillus oryzae*.

[0211] Een isolaat van een stam van *Fusarium oxysporum*, waarvan een fosfolipase volgens de uitvinding kan worden verkregen, is gedeponeerd volgens het Verdrag van Boedapest inzake de internationale herkenning van de deponering van micro-organismen ten behoeve van de octrooiprocedure, bij de Deutsche Sammlung
25 von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Bondsrepubliek Duitsland, (DSM).

| | |
|---------------------|--|
| Deponeringsdatum | 6 juni 1983 |
| Referentie indiener | NN041759 |
| DSM nr. | <i>Fusarium oxysporum</i> DSM nr. 2672 |

[0212] Verder is het expressieplasmide pYES 2.0, dat de cDNA-sequentie van
30 volledige lengte omvat die voor het fosfolipase volgens de uitvinding codeert,

getransformeerd in een stam van *Escherichia coli* die werd gedeponeerd volgens het Verdrag van Boedapest inzake de internationale herkenning van de deponering van micro-organismen ten behoeve van de octrooiprocedure, bij de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH., Mascheroder Weg 1b, D-38124

5 Braunschweig, Bondsrepubliek Duitsland, (DSM).

| | |
|---------------------|---------------------------------------|
| Deponeringsdatum | 25 november 1996 |
| Referentie indiener | NN049279 |
| DSM nr. | <i>Escherichia coli</i> DSM nr. 11299 |

Expressievectoren

10 [0213] De expressievector volgens de uitvinding kan elke expressievector zijn die op een geschikte wijze is onderworpen aan recombinant-DNA-werkwijzen, en de keuze van de vector zal dikwijls afhangen van de gastheercel waarin de vector moet worden ingebracht. Aldus kan de vector een autonoom replicerende vector zijn, d.w.z. een vector die voorkomt als een extra chromosomale eenheid, waarvan de replicatie
15 afhankelijk is van chromosomale replicatie, b.v. een plasmide. Als alternatief kan de vector een vector zijn die, als deze in een gastheercel wordt ingebracht, in het genoom van de gastheercel wordt geïntegreerd en wordt gerepliceerd tezamen met het (de) chromoso(o)m(en) waarin het is geïntegreerd.

[0214] In de expressievector moet de DNA-sequentie die voor het fosfolipase
20 codeert, werkzaam worden verbonden met een geschikte promoter- en beëindigersequentie. De promoter kan elke DNA-sequentie zijn die transcriptieactiviteit in de gastheercel vertoont. De werkwijzen die worden toegepast om de DNA-sequenties die voor het fosfolipase, de promoter en de beëindiger coderen, te ligeren en deze in geschikte vectoren te inserteren, zijn aan de deskundigen op dit gebied
25 algemeen bekend (zie b.v. Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY).

[0215] Voorbeelden van geschikte promoters voor gebruik in draadvormige schimmelgastheercellen zijn b.v. de ADH3-promoter (McKnight et al., The EMBO J. 4 (1985), 2093-2099). Voorbeelden van andere geschikte promoters zijn de promoters die
30 zijn afgeleid van het gen dat codeert voor *Aspergillus oryzae* TAKA amylase,

- Rhizomucor miehei* asparagineproteïnase, *Aspergillus niger*-neutrale α -amylase, *Aspergillus niger* zuurstabiel α -amylase, *Aspergillus niger* of *Aspergillus awamori* glucoamylase (gluA), *Rhizomucor miehei* lipase, *Aspergillus oryzae* alkalische protease, *Aspergillus oryzae* triosefosfaatisomerase of *Aspergillus nidulans* acetamidase.

Gastheercellen

- [0216] De onderhavige uitvinding heeft eveneens betrekking op recombinante gastheercellen, die een nucleïnezuursequentie volgens de uitvinding omvatten, welke cellen met voordeel kunnen worden gebruikt bij de recombinante productie van de polypeptiden. De uitdrukking "gastheercel" omvat elke nakomeling van een oudercel die niet identiek is aan de oudercel als gevolg van mutaties die tijdens replicatie plaatsvinden.
- [0217] De cel wordt bij voorkeur getransformeerd met een vector die een nucleïnezuursequentie volgens de uitvinding omvat, gevolgd door integratie van de vector in het gastheerchromosoom.
- [0218] "Transformatie" betekent het zodanig introduceren van een vector die een nucleïnezuursequentie volgens de onderhavige uitvinding omvat, in een gastheercel, dat de vector als een chromosomale integrant of als een zelf-replicerende extra-chromosomale vector behouden blijft. Integratie wordt over het algemeen als een voordeel beschouwd, aangezien de nucleïnezuursequentie zeer waarschijnlijk stabiel in de cel behouden blijft. Integratie van de vector in het gastheerchromosoom kan plaatsvinden door homologe of niet-homologe recombinatie, zoals hierboven is beschreven.
- [0219] In een voorkeursuitvoeringsvorm is de gastheercel een schimmelcel. "Schimmels", zoals hierin wordt gebruikt, omvat organismen *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, en *Zygomycota* (zoals gedefinieerd door Hawksworth et al., In: Ainsworth en Bisby's Dictionary of The Fungi, 8^e editie, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) alsook de *Oomycota* (zoals vermeld in Hawksworth et al., 1995, supra, blz. 171) en alle mitospore fungi (Hawksworth et al., 1995, supra). Representatieve groepen van *Ascomycota* omvatten b.v. *Neurospora*, *Eupenicillium* (= *Penicillium*), *Emericella* (= *Aspergillus*), *Eurotium* (= *Aspergillus*) en

de hierboven vermelde zuivere gisten. Voorbeelden van *Basidiomycota* omvatten champignons; roesten en zwammen. Representatieve groepen van *Chytridiomycota* omvatten b.v. *Allomyces*, *Blastocladiella*, *Coelomomyces* en waterschimmels.

Representatieve groepen van *Oomycota* omvatten b.v. saprolegniomycetous

- 5 waterschimmels, zoals *Achlya*. Voorbeelden van mitosporenschimmels omvatten *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida* en *Alternaria*. Representatieve groepen van *Zygomycota* omvatten b.v. *Rhizopus* en *Mucor*.

- [0220] In een voorkeursuitvoeringsvorm is de schimmelgastheercel een draadvormige schimmelcel. "Draadvormige schimmels" omvatten alle draadvormige
- 10 vormen van de onderverdelingen van *Eumycota* en *Oomycota* (zoals gedefinieerd door Haksworth et al., 1995, supra). De draadvormige schimmels worden gekenmerkt door een vegetatief mycelium dat is samengesteld uit chitine, cellulose, glucaan, chitosan, mannan en andere complexe polysacchariden. Vegetatieve groei is door zwamdradenverlenging en het koolstofkatabolisme is gedwongen aërobisch.
- 15 Daarentegen is de vegetatieve groei bij kweken zoals *Saccharomyces cerevisiae* door uitbotten van een unicellulaire thallus en koolstofkatabolisme kan fermentatief zijn. In een uitvoeringsvorm die meer de voorkeur heeft is de draadvormige schimmelgastheercel een cel van een species van *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolypocladium*
- 20 en *Trichoderma* of een teleomorf of synoniem daarvan zonder hiertoe beperkt te zijn. In een uitvoeringsvorm die zelfs meer de voorkeur heeft is een schimmelgastheercel een *Aspergillus*-cel. In nog een andere uitvoeringsvorm die meer de voorkeur heeft, is de draadvormige schimmelgastheercel een *Acremonium*-cel. In een andere uitvoeringsvorm die nog meer de voorkeur heeft, is de draadvormige
- 25 schimmelgastheercel een *Fusarium*-cel. In een andere uitvoeringsvorm die nog meer voorkeur heeft, is de draadvormige schimmelgastheercel een *Humicola*-cel. In een andere uitvoeringsvorm die nog meer voorkeur heeft is de draadvormige schimmelgastheercel een *Mucor*-cel. In een andere uitvoeringsvorm die nog meer voorkeur heeft is de draadvormige schimmelgastheercel een *Myceliophthora*-cel. In een
- 30 andere uitvoeringsvorm die nog meer voorkeur heeft is de draadvormige schimmelgastheercel een *Neurospora*-cel. In een andere uitvoeringsvorm die nog meer voorkeur heeft, is de draadvormige schimmelgastheercel een *Penicillium*-cel. In een andere uitvoeringsvorm die nog meer voorkeur heeft is de draadvormige

- schimmelgastheercel een *Thielavia*-cel. In een andere uitvoeringsvorm die nog meer voorkeur heeft is de draadvormige schimmelgastheercel een *Tolypocladium*-cel. In een andere uitvoeringsvorm die nog meer voorkeur heeft is de draadvormige schimmelgastheercel een *Trichoderma*-cel. In een uitvoeringsvorm die de meeste voorkeur heeft is de draadvormige schimmelgastheercel een *Aspergillus-awamori*, *Aspergillus-foetidus*-, *Aspergillus-japonicus*-, *Aspergillus-niger*- of *Aspergillus-oryzae*-cel. In een andere uitvoeringsvorm die de meeste voorkeur heeft is de draadvormige schimmelgastheercel een *Fusarium*-cel van de sectie *Discolor* (eveneens bekend als de sectie *Fusarium*). In een andere voorkeursuitvoeringsvorm is de draadvormige schimmeloudercel een *Fusarium*-stam van de sectie *Elegans*, b.v. *Fusarium oxysporum*. In een andere uitvoeringsvorm die de meeste voorkeur heeft is de draadvormige schimmelgastheercel een *Humicola-insolens*- of *Thermomyces-lanuginosa*-cel. In een andere uitvoeringsvorm die de meeste voorkeur heeft is de draadvormige schimmelgastheercel een *Rhizomucor-miehei*-cel. In een andere uitvoeringsvorm die de meeste voorkeur heeft is de draadvormige schimmelgastheercel een *Myceliophthora-thermophilum*-cel. In een andere uitvoeringsvorm die de meeste voorkeur heeft is de draadvormige schimmelgastheercel een *Neurospora-crassa*-cel. In een andere uitvoeringsvorm die de meeste voorkeur heeft is de draadvormige schimmelgastheercel een *Penicillium-purpurogenum*-cel. In een andere uitvoeringsvorm die de meeste voorkeur heeft is de draadvormige schimmelgastheercel een *Thielavia-terrestris*-cel. In een andere uitvoeringsvorm die de meeste voorkeur heeft is de *Trichoderma*-cel een *Trichoderma-harzianum*-, *Trichoderma-koningii*-, *Trichoderma-longibrachiatum*, *Trichoderma-reesei*- of *Trichoderma-viride*-cel.

- [0221] Schimmelcellen kunnen worden getransformeerd volgens een werkwijze die protoplastvorming, transformatie van de protoplasten en regeneratie van de celwand volgens een wijze die op zich bekend is, omvat. Geschikte werkwijzen voor de transformatie van *Aspergillus*-gastheercellen zijn beschreven in EP 238 023 en door Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81:1470-1474. Een geschikte werkwijze voor het transformeren van *Fusarium*-species is beschreven door Malardier et al., 1989, Gene 78:147-156 of in eveneens hangend US Nr. 08/269,449. Gist kan worden getransformeerd onder toepassing van de werkwijzen die beschreven zijn door Becker en Guarente, In Abelson, J.N. en Simon, M.I., ed., Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Deel 194,

- blz. 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153:163; en Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:1920. Zoogdiercellen kunnen worden getransformeerd volgens directe opname onder gebruikmaking van de precipitatiemethode met calciumfosfaat volgens Graham en Van der Eb (1978, Virology 52:546).

Werkwijze voor het produceren van fosfolipase

- [0222] De onderhavige uitvinding verschaft een werkwijze voor het produceren van een geïsoleerd enzym volgens de uitvinding, waarbij een geschikte gastheercel, die is getransformeerd met een DNA-sequentie die voor het enzym codeert, wordt gekweekt onder omstandigheden die de vorming van het enzym mogelijk maken, en het verkregen enzym uit de kweek wordt gewonnen.
- [0223] Als een expressievector die een DNA-sequentie omvat die voor het enzym codeert, in een heterologe gastheercel wordt getransformeerd, is het mogelijk heterologe recombinante productie van het enzym volgens de uitvinding mogelijk te maken.
- [0224] Daardoor is het mogelijk een sterk gezuiverde fosfolipasesamenstelling te verkrijgen die wordt gekenmerkt door het vrij zijn van homologe onzuiverheden.
- [0225] Volgens de onderhavige uitvinding kan de homologe gastheercel een stam van *Fusarium oxysporum* zijn.
- [0226] Het medium dat wordt gebruikt voor het kweken van de getransformeerde gastheercellen, kan elk gebruikelijk medium zijn dat geschikt is voor het kweken van de gastheercellen in kwestie. Het tot expressie gebrachte fosfolipase kan op een geschikte wijze in het kweekmedium worden uitgescheiden en kan daaruit volgens algemeen bekende werkwijzen met inbegrip van het afscheiden van de cellen van het medium door centrifugatie of filtratie, precipitatie van eiwithoudende bestanddelen van het medium door middel van een zout, zoals ammoniumsulfaat, gevolgd door chromatografiemethoden, zoals ionenuitwisselingschromatografie, affiniteitschromatografie en dergelijke, worden gewonnen.

Gebruik van fosfolipase

[0227] Naast het gebruik van een fosfolipase in een nieuwe werkwijze volgens de uitvinding voor het enzymatisch ontgomen van een eetbare olie die een hoge hoeveelheid niet-hydrateerbaar fosfor omvat is in de stand van de techniek een aantal andere toepassingen van fosfolipasen bekend.

5 [0228] Dergelijke in de stand van de techniek bekende gebruiken/toepassingen van fosfolipasen worden hierna beschreven.

[0229] Het fosfolipase volgens de uitvinding kan in elke toepassing worden gebruikt waarbij het gewenst is de vetacylgroep (EN) van een fosfolipide of lyso-fosfolipide, zoals lecithine of lyso-lecithine, te hydroliseren. Het fosfolipase wordt bij
10 voorkeur gebruikt bij een pH van 3-10 en bij 30-70°C (in het bijzonder 40-60°C). Indien het gewenst is kan het fosfolipase na de reactie worden geïnactiveerd door het aan een warmtebehandeling te onderwerpen, b.v. 1 uur bij een pH van 7, 80°C of 10 minuten bij 90°C.

[0230] Als een voorbeeld kan het fosfolipase volgens de uitvinding worden
15 gebruikt bij de bereiding van deeg, brood en koeken, b.v. door de elasticiteit van het brood of de koek te verbeteren. Aldus kan het fosfolipase worden gebruikt in een werkwijze voor het maken van brood, omvattende het toevoegen van het fosfolipase aan de bestanddelen van een deeg, het kneden van het deeg en het bakken van het deeg voor het maken van het brood. Dit kan op een wijze die analoog is aan de wijze volgens
20 US 4.567.046 (Kyowa Hakko), JP-A 60-78529 (QP Corp.), JP-A 62-111629 (QP Corp.), JP-A 63-258528 (QP Corp.) of EP 426211 (Unilever) worden uitgevoerd.

[0231] Het fosfolipase volgens de uitvinding kan eveneens worden gebruikt voor het verbeteren van de filtreerbaarheid van een waterige oplossing of suspensie van koolhydraatoorsprong door deze met het fosfolipase te behandelen. Dit is met name
25 toepasbaar bij een oplossing of suspensie die een zetmeelhydrolysaat, in het bijzonder een tarwezetmeelhydrolysaat bevat, aangezien dit er toe neigt moeilijk filtrilbaar te zijn en troebele filtraten te geven. De behandeling kan analoog aan die volgens EP 219 269 (CPC International) worden uitgevoerd.

[0232] Verder kan een fosfolipase volgens de uitvinding worden gebruikt voor
30 gedeeltelijke hydrolyse van fosfolipiden, bij voorkeur lecithine, voor het verkrijgen van verbeterde fosfolipide-emulgeermiddelen. Deze toepassing is verder beschreven in productbeschrijvingen voor LecitaseTM (Novo Nordisk A/S), die op het gebruik hiervan

betrekking hebben en in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (Uitgever: VCH Weinheim (1996)).

- [0233] Verder kan een fosfolipase volgens de uitvinding worden gebruikt in een werkwijze voor het produceren van een diervoeder, welke het mengen van het fosfolipase met voedingsstoffen en met ten minste één fosfolipide omvat. Dit kan op analoge wijze aan die van EP 743 017 worden uitgevoerd.

Ontgoming van plantaardige/eetbare oliën volgens in de stand van de techniek bekende werkwijzen

10

- [0234] Volgens in de stand van de techniek bekende werkwijzen kan het fosfolipase volgens de uitvinding worden gebruikt in een werkwijze voor het verminderen van het gehalte fosfolipide in een eetbare olie, omvattende het zodanig behandelen van de olie dat een belangrijk gedeelte van het fosfolipide wordt gehydrolyseerd, en het afscheiden van een waterige fase die het gehydrolyseerde fosfolipide bevat, van de olie. Deze werkwijze is toepasbaar voor de zuivering van elke eetbare olie die een fosfolipide bevat, b.v. plantaardige olie, zoals sojaolie, raapzaadolie en zonnebloemolie.

- [0235] Voorafgaand aan de enzymatische behandeling wordt de plantaardige olie bij voorkeur voorbehandeld om slijm (plantaardige gom) te verwijderen, b.v. door natte raffinage. Gewoonlijk zal de olie 50-250 ppm fosfor, zoals fosfolipide, bij het begin van de behandeling met fosfolipase bevatten en de werkwijze volgens de uitvinding kan deze waarde tot onder 11 ppm, met meer voorkeur onder 5 ppm, verminderen.

- [0236] De enzymatische behandeling wordt uitgevoerd door het dispergeren van een waterige oplossing van het fosfolipase, bij voorkeur als druppels met een gemiddelde diameter van minder dan 10 μ (micro)m. De hoeveelheid water is bij voorkeur 0,5-5 gew.%, betrokken op de olie. Een emulgeermiddel kan desgewenst worden toegevoegd. Mechanische agitatie kan worden toegepast om de emulsie te handhaven.

- [0237] De enzymatische behandeling kan worden uitgevoerd bij elke pH in het gebied van 1,5-8. De pH kan worden toegevoegd door het toevoegen van citroenzuur, een citraatbuffer of HCl.

[0238] Een geschikte temperatuur is in het algemeen 30-70°C (met name 40-60°C). De reactietijd zal gewoonlijk 0,5-12 uur (b.v. 2-6 uur) zijn, en een geschikte enzymdosering zal gewoonlijk 100-5000 IE per liter olie zijn, met name 200-2000 IE/l.

[0239] De enzymatische behandeling kan ladingsgewijs worden uitgevoerd, b.v. in
5 een tank onder roeren, of deze kan continu worden uitgevoerd, b.v. een reeks van geroerde tankreactors.

[0240] De enzymatische behandeling wordt gevolgd door het scheiden van een waterige fase en een oliefase. Deze scheiding kan volgens bekende middelen, b.v. centrifugatie, worden uitgevoerd.

10 [0241] Volgens andere aspecten kan de werkwijze worden uitgevoerd volgens in de stand van de techniek bekende principes, b.v. analoog aan die volgens US 5.264.367 (Metallgesellschaft, Röhm); K. Dahike & H. Buchold, INFORM, 6 (12), 1284-91 (1995); H. Buchold, Fat Sci. Technol., 95 (8), 300-304 (1993); JP-A 2-153997 (Showa Sangyo); of EP 654.527 (Metallgesellschaft, Röhm).

15

Gebruik van een fosfolipase volgens de uitvinding bij bakken

[0242] Het fosfolipase volgens de uitvinding kan eveneens worden gebruikt in brood verbeterende toevoegsels, b.v. deegsamenstellingen, deegtoevoegsels,
20 deegconditioneringsmiddelen, voormengsels, en soortgelijke preparaten die gewoonlijk aan het meel en/of het deeg worden toegevoegd tijdens werkwijzen voor het maken van brood of andere gebakken producten voor het verschaffen van verbeterde eigenschappen van brood of andere gebakken producten.

[0243] Derhalve heeft een uitvoeringsvorm van de uitvinding betrekking op een
25 brood verbeterend en/of deeg verbeterend preparaat en verder op het gebruik van een fosfolipase volgens de uitvinding in dergelijke preparaten, en op een deeg of een gebakken product, omvattende een brood verbeterend en/of en of een deeg verbeterend preparaat volgens de uitvinding.

[0244] In de onderhavige context wordt met de uitdrukkingen "brood verbeterend
30 preparaat" en "deeg verbeterend preparaat" bedoeld preparaten aan te geven die naast het enzymbestanddeel andere stoffen kunnen omvatten die gewoonlijk bij het bakken worden gebruikt om de eigenschappen van deeg en/of gebakken producten te verbeteren. Voorbeelden van dergelijke bestanddelen worden hierna gegeven.

[0245] In de onderhavige context wordt met de uitdrukking "verbeterde eigenschappen" bedoeld elke eigenschap aan te geven die kan zijn verbeterd door de werking van een fosfolipase-enzym volgens de uitvinding. In het bijzonder heeft het gebruik van fosfolipase een toegenomen volume en een verbeterde kruimelstructuur en
 5 anti-verouderingseigenschappen van het gebakken product, alsook een toegenomen sterkte, stabiliteit en verminderde kleverigheid en daardoor een verbeterde machinale verwerkbaarheid van het deeg tot gevolg. Gebleken is dat het effect op het deeg met name goed is als een slechte kwaliteit meel is gebruikt. De verbeterde machinale verwerkbaarheid is van bijzonder belang met betrekking tot deeg dat industrieel moet
 10 worden verwerkt.

[0246] De verbeterde eigenschappen worden geëvalueerd door vergelijking met deeg en/of gebakken producten die zijn bereid zonder toevoeging van fosfolipase volgens de onderhavige uitvinding.

[0247] Het brood en/of deeg verbeterende preparaat volgens de uitvinding kan
 15 verder een ander enzym omvatten. Voorbeelden van andere enzymen zijn een cellulase, een halfcellulase, een pentosanase (bruikbaar voor de gedeeltelijke hydrolyse van pentosanen die de uittrekbaarheid van het deeg verhogen), een glucose-oxidase (bruikbaar voor het versterken van het deeg), een lipase (bruikbaar voor de modificatie van lipiden die zich in het deeg of in de deegbestanddelen bevinden teneinde het deeg
 20 zacht te maken), een peroxidase (bruikbaar voor het verbeteren van de deegconsistentie), een protease (bruikbaar voor het week maken van gluten, met name als hard tarwemeel wordt gebruikt), een peptidase en/of een amylase, b.v. α -amylase (geschikt voor het verschaffen van door gist fermenteerbare suikers).

[0248] Naast of als alternatief voor andere enzymbestanddelen kan het deeg
 25 verbeterende en/of brood verbeterende preparaat een gewoonlijk gebruikt bakmiddel omvatten, b.v. één of meer van de volgende bestanddelen:

[0249] Een melkpoeder (dat de korstkleur verschaft), gluten (om de gasretentiekracht van zwakke degen te verbeteren), een emulgeermiddel (om de deeguittrekbaarheid en in enige mate de consistentie van het verkregen brood te
 30 verbeteren), gekorrelt vet (voor deegverzachting en consistentie van het brood), een oxidans (toegevoegd om de glutenstructuur te versterken; b.v. ascorbinezuur, kaliumbromaat, kaliumjodaat of ammoniumpersulfaat), een aminozuur (b.v. cysteine),

een suiker en zout (b.v. natriumchloride, calciumacetaat, natriumsulfaat of calciumsulfaat dat dient om het deeg steviger te maken), meel of zetmeel.

[0250] Voorbeelden van geschikte emulgeermiddelen zijn mono- of diglyceriden, diacetylwijnsteenzuuresters van mono- of diglyceriden, suikeresters van vetzuren, 5 polyglycerolesters van vetzuren, melkzuuresters van monoglyceriden, azijnzuuresters van monoglyceriden, polyoxyethyleenstearaten, fosfolipiden en lecithine.

[0251] In de onderhavige context wordt met de uitdrukking "gebakken product" bedoeld dat dit elk product omvat dat van deeg is bereid, ofwel een zacht product of een bros product. Voorbeelden van gebakken producten, hetzij van een wit type, een 10 licht type of een donker type die met voordeel volgens de onderhavige uitvinding kunnen worden gevormd, zijn brood (in het bijzonder witbrood, volkorenbrood of roggebrood), gewoonlijk in de vorm van broden of broodjes, Frans stokbrood, pitabrood, taco's, koeken, pannenkoeken, biscuits, toast en dergelijke.

[0252] Het deeg volgens de uitvinding kan van elk van de hierboven besproken 15 typen zijn en kan vers of bevroren zijn.

[0253] Aan de hand van de hierboven vermeldde beschrijving zal het duidelijk zijn dat het deeg van de uitvinding gewoonlijk een gistdeeg is of een deeg dat aan gisting wordt onderworpen. Het deeg kan men op verschillende wijzen laten rijzen, zoals door het toevoegen van natriumbicarbonaat en dergelijke of door het toevoegen van een 20 rijsmiddel (gistdeeg), maar het heeft de voorkeur het deeg te laten rijzen door het toevoegen van een geschikte gistkweek, zoals een kweek van *Saccharomyces cerevisiae* (bakkersgist). Elk van de in de handel verkrijgbare *S.-cerevisiae*-stammen kan worden toegepast.

[0254] In een laatste uitvoeringsvorm heeft de uitvinding betrekking op het 25 gebruik van een fosfolipase volgens de uitvinding voor de bereiding van pastadeeg, bij voorkeur bereidt van meel van harde tarwe of van een meel van vergelijkbare kwaliteit. Het deeg kan worden bereid onder toepassing van bekende technieken en het fosfolipase kan worden gebruikt in een vrijwel gelijke dosering als de hierboven beschreven dosering. Het fosfolipase is bij voorkeur van microbiële oorsprong, b.v. 30 zoals hierin is beschreven. Beoogd wordt dat het fosfolipase bij de bereiding van pasta een versterking van de glutenstructuur en derhalve een vermindering van de kleverigheid van het deeg en een verhoogde deegsterkte tot gevolg heeft.

Gebruik van lipase-activiteit van een enzym volgens de uitvinding.

[0255] Zoals in werkvoorbeelden hierin wordt getoond, kan een fosfolipase volgens de uitvinding verder lipase-activiteit bezitten.

- 5 [0256] Dienovereenkomstig heeft de uitvinding verder betrekking op de toepassing van deze lipase-activiteit in standaardtoepassingen van een lipase, in het bijzonder voor gebruik in schoonmaaksamenstellingen en detergenssamenstellingen. Dergelijke schoonmaak- en detergenssamenstellingen zijn in de stand van de techniek goed beschreven en er wordt verwezen naar WO 96/34946; WO 96/07202; en WO 95/30011
- 10 voor een verdere beschrijving van geschikte schoonmaak- en detergenssamenstellingen.

[0257] De uitvinding wordt in de volgende voorbeelden die op geen enkele wijze zijn bedoeld om de omvang van de uitvinding waarvoor rechten worden gevraagd, te beperken, gedetailleerd beschreven.

15 Materialen en werkwijzen

Gedeponeerde organismen:

- [0258] *Fusarium oxysporum* DSM Nr. 2672 omvat de DNA-sequentie volgens de uitvinding die voor het fosfolipase codeert.
- 20

[0259] *Escherichia coli* DSM 11299 die het plasmide in de "shuttle" vector pYes 2.0 bevat dat de cDNA-sequentie van volledige lengte die voor het fosfolipase volgens de uitvinding codeert, omvat.

25 Andere stammen:

[0260] Giststam: de gebruikte giststam *Saccharomyces cerevisiae* was W3124 (MATa; ura 3-52; leu 2-3, 112; his 3-D200; pep 4-1137; prcl::HIS3; prbl::LEU2; cir+).

30

E.-coli-stam: DH10B (Life Technologies)

Plasmiden:

[0261] De *Aspergillus* expressievector pHD414 is een derivaat van het plasmide p775 (beschreven in EP 238 023). De constructie van pHD414 is verder beschreven in WO 93/11249.

5

pYES 2.0 (invitrogen)

pA2PH10 (zie voorbeeld 7)

10 Algemene werkwijze van moleculaire biologie.

[0262] Tenzij anders is vermeldt werden de DNA-modificaties en -transformaties uitgevoerd onder toepassing van standaardwerkwijzen van moleculaire biologie (Sambrook et al (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F.M. et al. (eds.) "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C.R., en Cutting, S.M. (eds.) "Molecular Biological Methods for Bacillus", John Wiley and Sons, 1990)

15

[0263] Enzymen voor DNA-modificaties werden gebruikt volgens de voorschriften van de leveranciers.

20

Enzymen voor DNA-modificaties.

[0264] Tenzij anders is vermeld zijn alle enzymen voor DNA-manipulaties zoals b.v.. restrictie-endonucleasen, ligasen, enz., verkregen van New England Biolabs, Inc.

25

Bepaling van fosfolipase-activiteit op basis van de NEFA-C test:

[0265]

30 Substraat: L- α -lysofosfatidylcholine (Sigma).

Substraat: Sojaboon lecithine (Sigma #P3644). Gebruikt voor het meten van fosfolipase A-activiteit.

NEFA-C testsamenstelling is van Wako Chemicals Germany.

Buffer: 20 mM NaOAc pH 4,5.

[0266] Substraatoplossing: 10 mg substraat in 1 mL milli Q water en 1 mL buffer (maak genoeg substraatoplossing voor alle monsters)

5

1. 15 µl enzym wordt toegevoegd aan 150 µl substraatoplossing.
2. Incubatie 10 min. bij 40°C.
3. 30 µl wordt overgebracht naar 300 µl reagens 1 (van NEFA-samenstelling).
4. Incubatie 10 min. bij 37°C

10

5. Toevoeging van 600 µl reagens (van NEFA-samenstelling)
6. Incubatie 10 min. bij 37°C
7. Absorptie van het uiteindelijke reactieproduct wordt gemeten bij 550nm volgens de voorschriften van de NEFA-samenstelling.

15 [0267] De enzymactiviteit die vereist is voor het produceren van één µmol vetzuur per minuut van de enzymreactie werd als één eenheid gedefinieerd.

Expressiekloning in gist

20 [0268] Expressiekloning in gist werd uitgevoerd zoals uitvoerig is beschreven door H. Dalboege et al. (H. Dalboege et al., Mol. Gen. Genet (1994) 243:253-260; WO 93/11249; WO 94/14953), dat hierin door verwijzing is opgenomen.

[0269] Alle afzonderlijke stappen van de extractie van totaal RNA, cDNA-synthese, mung bean nucleasebehandeling, stomp maken met T4 DNA-polymerase en
25 de constructie van banken werd volgens de hierboven vermeldde verwijzingen uitgevoerd.

Fermentatiewerkwijze van *Fusarium oxysporum* DSM Nr. 2672 voor mRNA-isolatie:

30 [0270] *Fusarium oxysporum* DSM Nr. 2672 werd 4 dagen bij 30°C in YPD-medium gekweekt. 10 µl supernatant werd in de hierna beschreven plaatbepaling op fosfolipase-activiteit getest.

[0271] mRNA werd uit mycelium van deze kweek geïsoleerd zoals beschreven is door H. Dalboege et al., Mol. Gen. Genet (1994), 243:253-260; WO 93/11249 en WO 94/14953.

5 Identificatie van positieve gistklonen (plaatbepaling):

[0272] Identificatie van positieve gistklonen (d.w.z. klonen die een gen omvatten dat voor fosfolipase-activiteit codeert) werd uitgevoerd zoals hierna wordt beschreven.

[0273] De gisttransformanten worden uitgezet op een plaat op SC-agar die 2% glucose bevat, en worden drie dagen bij 30°C geïncubeerd. Een celluloseacetaatfilter (OE67, Schleicher & Schuell) wordt boven de cellen geplaatst en vervolgens overgebracht naar de platen die SC-agar en 2% galactose bevatten, met de cellen bovenop het filter. Na drie dagen incubatie bij 30°C werd het filter met de cellen naar substraatplaten overgebracht. Positieve klonen worden geïdentificeerd als kolonies een
10
15 blauw-groen zone in de substraatplaat onder de kolonie vormen.

[0274] De substraatplaten worden op de volgende wijze gevormd: 2,5 g-agar (BA-30 INA Agar®, Funakoshi Co. Ltd.) wordt toegevoegd aan 137,5ml H₂O, tot koken in een magnetron verwarmd. Na afkoeling tot ongeveer 60°C wordt 30 ml van het volgende mengsel toegevoegd: 62,5 ml, 0,4 M Tris-HCl buffer (pH 7,5) en 50 ml 3%
20 Lipoid E80 (Lipoid GmbH, D-67065 Ludwigshafen, Duitsland) opgelost in 2% Triton X-100 (vol./vol.) en 0,5 ml 2% Brilliant Green oplossing in H₂O. De concentratie van het substraat is belangrijk. Indien de concentratie te hoog is kan het achtergrondactiviteit van de gistcellen en/of van draadvormige schimmellipasen met fosfolipase-nevenactiviteit vormen.

25

Isolatie van een cDNA-gen voor expressie in *Aspergillus*:

[0275] Een fosfolipase producerende gistkolonie wordt geïnoculeerd in 20 ml YPD-suspensie in een glazen testbuisje van 50 ml. Het busje wordt 2 dagen bij 30 °C
30 geschud. De cellen worden verzameld door 10 min. centrifugatie bij 3000 rpm.

[0276] DNA wordt geïsoleerd volgens WO 94/14953 en opgelost in 50 ml water. Het DNA wordt volgens standaard werkwijzen in *E.coli* getransformeerd. Plasmide-DNA wordt uit *E.coli* geïsoleerd onder toepassing van standaard werkwijzen en door

middel van restrictie-enzym analyse geanalyseerd. De cDNA-insertie wordt uitgeknipt onder toepassing van geschikte restrictie enzymen en geligeerd in een *Aspergillus* expressie vector.

5 Transformatie van *Aspergillus oryzae* of *Aspergillus niger*

[0277] Protoplasten kunnen worden bereid zoals beschreven is in WO 95/02043, blz. 16, regel 21 - blz. 17, regel 12, en is hierin door verwijzing is opgenomen.

- [0278] 100 µl protoplastsuspensie wordt gemengd met 5-25 µg van het geschikte DNA in 10 µl STC (1,2 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5, 10 mM CaCl₂). Protoplasten worden gemengd met p3SR2 (een plasmide dat het *A. nidulans* amdS-gen draagt). Het mengsel laat men 25 minuten bij kamertemperatuur staan. 0,2 ml van 60% PEG 4000 (BDH 29576), 10 mM CaCl₂ en 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 worden toegevoegd en zorgvuldig gemengd (2x) en tenslotte wordt 0,85 ml van dezelfde oplossing toegevoegd en zorgvuldig gemengd. Het mengsel laat men 25 minuten staan, wordt 15 minuten bij 2500 g gecentrifugeerd en de korrel wordt opnieuw in 2 ml in 1,2 M sorbitol gesuspendeerd. Na nog een sedimentatie worden de protoplasten op minimale platen uitgespreid (Cove, Biochem. Biophys. Acta 113 (1966) 51-56) die 1,0 M sucrose, pH 7,0, 10 mM aceetamide als stikstof bron en 20mM CsCl om de achtergrondgroei te remmen, bevatten. Na 4-7 dagen incubatie bij 37°C worden sporen eruit genomen en voor afzonderlijke kolonies verspreid. Deze werkwijze wordt herhaald en sporen van een afzonderlijke kolonie na de tweede herisolatie worden als een gedefinieerde transformant bewaard.

25 Test van transformanten van *A. oryzae* of *Aspergillus niger*

- [0279] Elk van de *A. oryzae*-transformanten wordt geïnoculeerd in 10 ml YPM (zie hierna) en vermeerderd. Na 2-5 dagen incubatie bij 30 °C wordt het supernatant verwijderd. 20 µl supernatant wordt geladen in gaten die in een substraatplaat zijn geponst (zie hierboven). Na 1-24 uur verschijnt fosfolipase-activiteit als een blauw-groene zone rondom het gat.

Fermentatie met gevoede lading.

[0280] Fermentatie met gevoede lading werd uitgevoerd in een medium omvattende maltodextrine als een koolstofbron, ureum als een stikstofbron en gistextract. De fermentatie met gevoede lading werd uitgevoerd door het inoculeren van een schudkolfkweek van *A.oryzae* gastheercellen in kwestie in een medium omvattende 3,5 % van de koolstofbron en 0,5 % van de stikstofbron. Na 24 uur kweken bij een pH van 7,0 en bij 34 °C werd de continue toevoer van extra koolstof- en stikstofbronnen geïnitieerd. De koolstofbron werd als de beperkende factor gehouden en verzekerd werd dat stikstof in overmaathoeveelheden aanwezig was. De kweek met gevoede lading werd 4 dagen voortgezet.

Isolatie van de in SEQ ID nr.1 getoonde DNA-sequentie.

[0281] Het voor fosfolipase coderende gedeelte van de in SEQ ID nr.1 getoonde DNA-sequentie die voor het fosfolipase van de uitvinding codeert, kan worden verkregen van het gedeponeerde organisme *Escherichia coli* DSM 11299 door extractie van plasmide-DNA volgens in de stand van de techniek bekende werkwijzen (Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY).

Media

- [0282] YPD: 10 g gistextract, 20 g pepton, H₂O tot 900 ml. In de autoclaaf verhit, 100 ml 20 % glucose (steriel gefiltreerd) toegevoegd.
- [0283] YPM: 10 g gistextract, 20 g pepton, H₂O tot 900 ml. In de autoclaaf verhit, 100 ml 20 % maltodextrine (steriel gefiltreerd) toegevoegd.
- [0284] 10x basaal zout: 75 g giststikstofbase, 113 g barnsteenzuur, 68 g NaOH, H₂O ad 1000 ml, steriel gefiltreerd.
- [0285] SC-URA: 100 ml 10 x basaal zout, 28 ml 20 % casaminozuren zonder vitaminen, 10 ml 1 % tryptofaan, H₂O ad 900 ml, in een autoclaaf verhit, 3,6 ml 5 % threonine en 100 ml 20 % glucose of 20 % toegevoegd.
- [0286] SC-agar; SC-URA, 20 g/l agar toegevoegd

[0287] SC-variant agar: 20 g agar, 20 ml 10 x basaal zout, H₂O ad 900 ml, in de autoclaaf verhit

[0288] PEG 4000 (polyethyleenglycol, molecuulgewicht - 4000) (BDH, Engeland)

5 Voorbeelden

Voorbeeld 1

Fermentatie van *Fusarium oxysporum* fosfolipase

10

[0289] Een kweek van *Fusarium oxysporum* DSM 2672, op een schuine kweekbodem met agar werd overgebracht naar vijf schudkolven van 500 ml, elk met 100 ml Bouillon-3-medium en één dag bij 30 °C geschud (200 rpm, amplitude 2,5 cm).

[0290] De samenstelling van het Bouillon-3-medium was als volgt:

15

| | |
|---|---------|
| Pepton | 6 g/l |
| Met trypsine aan digestie onderworpen caseïne | 4 g/l |
| Gist-extract | 3 g/l |
| Vleesextract | 1,5 g/l |
| Glucose | 1 g/l |

[0291] Het medium werd 40 minuten bij 121 °C in een autoclaaf verhit.

[0292] De kweek suspensie van deze schudkolven met Bouillon-3 werd als een entkweek gebruikt voor het inoculeren van twintig 500 ml schudkolven, elk met 200 ml

20 PL-1-medium.

[0293] De samenstelling van het PL-1-medium was als volgt:

25

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Pepton | 10 g/l |
| Tween®-80 | 12 g/l |
| MgSO ₄ ; 7H ₂ O | 2 g/l |
| CaCl ₂ ; SH ₂ O | 0,1 g/l |
| pH vóór verhitten in een autoclaaf | 6,0 |

[0294] Het medium werd 40 minuten bij 121 °C in een autoclaaf verhit.

- [0295] Elke PL-1 schudkolf werd geïnoculeerd met 0,5-2 ml kweek suspensie Bouillon-3 kweek suspensie, en 5 dagen bij 30 °C bij 200 rpm (amplitude 2,5 cm) geschud. De kweek suspensie van de schudkolven werd bij de oogst bijeen gevoegd, totaal 3,9 l met een enzymopbrengst van 53 LU/ml.

Voorbeeld 2

10 Zuivering van fosfolipase

- [0296] Stap 1) Eén liter fermentatiesupernatant werd gecentrifugeerd en het verkregen precipitaat werd weggedaan. Het supernatant werd vervolgens ingesteld op 0,8 M ammoniumacetaat door het toevoegen van vast ammoniumacetaat.
- 15 [0297] Stap 2) – Hydrofobe chromatografie – Toyoparelbetyl 650 C –matrix werd gekocht van Toso Hass (Röhm and Haas company, Duitsland). Een kolom van vijftig ml werd met de matrix gepakt. De kolom werd gewassen met 50 % ethanol en vervolgens met water. De kolom werd vervolgens met 0,8 M ammoniumacetaat in evenwicht gebracht. Het fermentatiesupernatant dat met 0,8 M ammoniumacetaat werd
- 20 ingesteld, werd vervolgens op de kolom aangebracht. Niet-gebonden materiaal werd vervolgens met 0,8 M ammoniumacetaat gewassen totdat al het UV-absorberende materiaal (280 nm) was verwijderd.
- [0298] De kolom werd vervolgens met water en daarna met 50 % ethanol geëluëerd.
- 25 [0299] De fosfolipase-activiteit werd bij een pH van 4,5 en 40 °C bepaald onder gebruikmaking van de NEFA-samenstelling zoals hierboven is beschreven. Fracties die activiteit in water en in alcoholelueaat bevatten, werden bijeen gevoegd. De activiteit

werd bepaald bij een pH van 4,5 onder gebruikmaking van de bepaling met een NEFA-samenstelling.

[0300] Fracties die fosfolipase-activiteit bevatten, werden vervolgens bijeen gevoegd en gedialyseerd en geconcentreerd onder gebruikmaking van een Amicon
5 ultrafiltratiemembraan met een begrenzing van 10 kDa.

[0301] Stap 3 –Negatieve absorptie op DEAE snelstromende chromatografie.

[0302] DEAE FF werd gekocht van Pharmacia en een 50 ml kolom werd met de matrix gepakt.

[0303] De kolom werd vervolgens gewassen zoals beschreven is door de fabrikant
10 en in evenwicht gebracht met 25 mM Tris acetaatbuffer, pH7.

[0304] Het gedialyseerde en geconcentreerde monster werd vervolgens ingesteld op een pH van 7 en het geleidingsvermogen op 2 mSi. en aangebracht op een anionuitwisselingskolom van DEAE FF.

[0305] De activiteit werd als effluent verzameld. De activiteit bindt niet aan
15 anionuitwisselaar bij een pH van 7.

[0306] Het effluent van het DEAE FF dat activiteit bezit, werd geconcentreerd en gedialyseerd onder gebruikmaking van een Amicon membraan met een begrenzing van 10 kDa, en als buffer 25 mM natriumacetaatbuffer, pH 6.

[0307] Gelfiltratie op Superdex 75.

20 [0308] Een met Superdex 75 voorgepakte kolom met Hiload Tm 16/60 van Pharmacia werd gewassen en in evenwicht gebracht met 25mM natriumacetaat, pH 6, die 150 mM NaCl bevatte.

[0309] Twee ml van het geconcentreerde effluent van anionuitwisselaar die fosfolipase-activiteit bezit bij pH 4,5 en 40 °C, werd op de superdex kolom
25 aangebracht.

[0310] De activiteit werd afgescheiden door gelfiltratie met een debiet van 1 ml/minuut.

Voorbeeld 3

30

Karakterisering van gezuiverd fosfolipase, verkregen van *Fusarium oxysporum*.

[0311] Een karakterisering zoals hierna wordt beschreven werd uitgevoerd op een *Fusarium oxysporum* fosfolipase, gefermenteerd zoals beschreven is in voorbeeld 1, en gezuiverd zoals beschreven is in voorbeeld 2.

5 [0312] Het molecuulgewicht van het fosfolipase-enzym werd bepaald onder gebruikmaking van 4 tot 20 % SDS-PAGE voorgietplaten van Novex Tm. Het molecuulgewicht van het eiwit werd onder reducerende omstandigheden bepaald, zoals eerder is beschreven.

[0313] Het molecuulgewicht van het fosfolipase van *F. oxysporum* bleek onder reducerende omstandigheden 29-30 kDa te zijn.

10 [0314] Het iso-elektrische punt werd bepaald onder gebruikmaking van Ampholine PAGE platen van Pharmacia.

[0315] Voor het *F. oxysporum* bleek de pI van het eiwit een ongeveer neutrale pH te zijn, bij voorkeur in het gebied van 5,8 tot 6,8.

15 Thermische stabiliteit van fosfolipase.

[0316] De thermische stabiliteit van fosfolipase van *Fusarium oxysporum* werd getest door middel van DSC (Differential Scanning Calorimetry). De thermische denatureringstemperatuur, Td, werd genomen als de bovenkant van de
20 denatureringspiek in thermogrammen (Cp vs. T) verkregen na verwarming van enzymoplossingen bij een constante geprogrammeerde verwarmingssnelheid.

Experimenteel:

25 [0317] Een DSC II van Hart Scientific (Utah, US, 1993) werd voor de experimenten gebruikt.

[0318] 50 mM gebufferde oplossingen werden als oplosmiddel voor het enzym gebruikt (ongeveer 2 mg/ml) op ofwel pH 10 (50 mM Glycinebuffer), pH 7 (50 mM HEPES-buffer + 10 mM EDTA) of pH 4 (50 mM Citraatbuffer). Het enzym werd
30 volgens voorbeeld 2 hierboven gezuiverd.

[0319] 750 µl enzymoplossing werd overgebracht in standaard 1 ml afsluitbare Hastelloy ampullen van Hart Scientific. De ampullen werden in de calorimeter geladen en 15 minuten tot 5 °C gekoeld. Het thermisch in evenwicht brengen werd uitgevoerd

voorafgaand aan de DSC-scan. De DSC-scan werd uitgevoerd van 5 °C tot 95 °C bij een scansnelheid van ongeveer 90 K/uur. Denaturatietemperaturen werden bepaald bij een nauwkeurigheid van ongeveer +/- 2 °C.

5 Resultaten

Tabel nr.1: Top bij denatureringspiek als een functie van pH

10

[0320]

| pH | Td(°C) |
|----|--------|
| 4 | 57°C |
| 7 | 62°C |
| 10 | 55°C |

[0321] Opgemerkt wordt dat deze experimenten werden uitgevoerd bij
15 afwezigheid van een oliematrix die de enzymstabiliteit aanzienlijk kan beïnvloeden. De DSC-resultaten geven een maximale stabiliteit nabij neutrale pH aan.

[0322] Uitgaande van een onomkeerbare thermische denaturatie is een relevante uitvoeringstemperatuur in een industriële toepassing zoals het ontgomen van oliën (US 5.264.367) ten minste ongeveer tien graden lager dan de in tabel nr.1 vermelde
20 Td-temperaturen.

Amino-eindstandige sequentie

[0323] Amino-eindstandige analyse werd bepaald onder gebruikmaking van
25 Edman-degradatie met een uitrusting van Applied Biosystem (ABI 473A eiwitsequentiebepalingsinrichting, Applied Biosystem, USA) uitgevoerd zoals door de fabrikant is beschreven.

N-eindstandige sequentie(s):

[0324] Voor het *F. oxysporum* fosfolipase is de N-eindstandige sequentie:

N-uiteinde A-V-G-V-T-T-T-D-F-S-N-F-K-F-Y-I

5 [0325] Het N-eindstandige aminozuur "A" (Ala) is positie 31 in SEQ ID Nr. 2. Dit geeft aan dat het volwaardige fosfolipase-enzym volgens de uitvinding begint op positie 31 in SEQ ID Nr. 2.

[0326] Dientengevolge is de volwaardige sequentie van 31-346 in SEQ ID Nr. 2.

Voorbeeld 4

10

Fosfolipase-A-activiteit

[0327] De fosfolipase-A-activiteit werd bepaald met Soybean Lecithin als substraat, zoals hierboven is beschreven (NEFA testbasenbepaling) bij pH 4,5 bij 40°C.

15 [0328] Het *F.-oxysporum*-fosfolipase vertoonde aanzienlijke fosfolipase-A-activiteit onder de hierboven beschreven omstandigheden.

Voorbeeld 5

20 Activiteit tegen L- α -lysofosfatidylcholine

[0329] De fosfolipase-activiteit werd bepaald met L- α -lysofosfatidylcholine als substraat, zoals hierboven is beschreven (NEFA testbasenbepaling) bij een pH van 4,5 bij 40°C.

25 [0330] Het *F.-oxysporum*-fosfolipase vertoonde aanzienlijke activiteit tegen L- α -lysofosfatidylcholine onder de hierboven omschreven omstandigheden.

Voorbeeld 6

30 Fosfolipase-activiteit in monolaagopstelling

[0331] Een monolaaguitrusting (volledig nulde orde, KSV 5 Instruments, Finland) is gebruikt om de activiteit van verschillende enzymen tegen het fosfolipide DDPC (Di Dicanoyl (C10) Fosfatidylcholine) te evalueren.

5 Experimenten

[0332] Op een grondig gezuiverd oppervlak van een bufferoplossing (10 mM Tris, pH 8,0, 25°C) werd een monolaag van DDPC van een chloroformoplossing verspreid. Na relaxatie van de monolaag (afdamping van chloroform) wordt de oppervlaktedruk ingesteld op 15 mN/m, hetgeen overeenkomt met een gemiddeld molecuulgebied van DDPC van ongeveer $63 \text{ \AA}^2/\text{molecuul}$. Een bufferoplossing (zie hierboven) die ongeveer 60 μg (microgram) enzym bevat, wordt door de monolaag in de subfase van het reactiecompartiment (cilinder met een gebied van 1520 mm^2 en een volume van 30.400 mm^3) geïnjecteerd in de "volledig nulde orde". Enzymatische activiteit wordt vertoond door de snelheid van een mobiele barrière die de monolaag samendrukt teneinde constante oppervlaktedruk te behouden als niet-oplosbare substraatmoleculen worden gehydrolyseerd tot meer in water oplosbare reactieproducten. Nadat is geverifieerd dat de oplosbaarheid in water van de reactieproducten (caprinezuur en DDPC) aanzienlijk hoger is dan voor DDPC, wordt het aantal DDPC-moleculen dat per minuut door het enzym wordt gehydrolyseerd, berekend aan de hand van het gemiddelde molecuulgebied (MMA) van DDPC.

Resultaten

25 [0333]

30

Tabel 2

| Activiteit van enzymen tegen DDPC in een monolaagopstelling | |
|---|-------------------------|
| Enzym | Activiteit (nmol/min)*) |
| Sigma P9279 (PLA2 van bijengif, 850 E/mg | 1,9 |
| Enzym van <i>Fusarium oxysporum</i> | 2,7 |
| <i>Candida antarctica</i> B bestanddeel lipase | 0 |
| <i>Candida antarctica</i> A bestanddeel lipase | 0 |
| Recombinant lipase van marmottenpancreas (rGPL) | 0,2 |
| Lipolase® (Novo Nordisk A/S) | < 0,1 |

*) Berekend aan de hand van de vermindering in monolaaggebied per tijdseenheid, geïnduceerd door de aanwezigheid van enzym.

- [0334] "Enzym van *F. Oxysporum*" in tabel 2 is een fosfolipase volgens de
5 uitvinding, gezuiverd zoals beschreven is in voorbeeld 2.

Conclusie

- [0335] Geen fosfolipase-activiteit werd gedetecteerd voor de meeste enzymen,
10 uitgezonderd lipasen die werden verkregen van marmottenlipase, die geringe
fosfolipase-activiteit vertoonden.
- [0336] Het fosfolipase volgens de uitvinding dat verkregen werd van *Fusarium
oxysporum*, vertoonde verrassenderwijs zeer aanzienlijke fosfolipase-activiteit.
- [0337] Dientengevolge wordt in de onderhavige uitvinding de uitdrukking
15 "fosfolipase-activiteit" die hierin wordt gebruikt in samenhang met een fosfolipase
volgens de uitvinding, gedefinieerd als een activiteit waarin de hierboven vertoonde
monolaag-fosfolipasebepaling ten minste 0,25 nmol/min, enzymdosering: 60 µg; met
meer voorkeur ten minste 0,40 nmol/min, enzymdosering: 60 µg; met meer voorkeur
ten minste 0,75 nmol/min, enzymdosering: 60 µg; met meer voorkeur ten minste 1,0
20 nmol/min, enzymdosering: 60 µg; met meer voorkeur ten minste 1,25 nmol/min,
enzymdosering: 60 µg; en met zelfs nog meer voorkeur ten minste 1,5 nmol/min,
enzymdosering: 60 µg is.
- [0338] De uitdrukking "lipase met fosfolipase-nevenactiviteit" wordt
dienovereenkomstig gedefinieerd als een lipase met een fosfolipase-nevenactiviteit
25 waarbij de fosfolipase-nevenactiviteit in de "monolaag-fosfolipasebepaling" zoals is

getoond in voorbeeld 6, minder is dan de hierboven vermelde cijfers die fosfolipase-activiteit weergeven.

- [0339] Een voorbeeld van een lipase met fosfolipase-nevenactiviteit volgens de definities hierin is het in tabel 2 hierboven getoonde marmottenlipase. Dit
- 5 marmottenlipase heeft een fosfolipase-nevenactiviteit in de "monolaag-fosfolipasebepaling" die minder is dan 0,25 nmol/min, enzymdosering: 60 µg.

Voorbeeld 7

10 Klonering en expressie van een fosfolipase van *Fusarium oxysporum* DSM Nr. 2672

[0340] Klonering en expressie werden uitgevoerd onder toepassing van de techniek van expressieklonering in gist, zoals hierboven is beschreven.

- [0341] mRNA werd geïsoleerd uit *Fusarium oxysporum*, DSM Nr. 2672, gekweekt
- 15 zoals hierboven is beschreven, met inbegrip van agitatie om voldoende beluchting te waarborgen. Mycelia werden na 3-5 dagen kweken verzameld, onmiddellijk in vloeibare stikstof bevroren en bij -80°C bewaard. Een bank van *Fusarium oxysporum*, DSM Nr. 2672, bestaande uit ongeveer 9×10^5 afzonderlijke klonen, werd in *E. coli* geconstrueerd zoals beschreven is, met een vectorachtergrond van 1%. Plasmide-DNA
- 20 van sommige van de verzamelingen werd in gist getransformeerd en 50-100 platen die 250-400 gistkolonies bevatten, werden van elke verzameling verkregen.

- [0342] Fosfolipase-positieve kolonies werden op substraatplaten geïdentificeerd en geïsoleerd (zie hierboven). cDNA-inserties werden direct van de gistkolonies geamplificeerd en gekarakteriseerd, zoals beschreven is in de sectie Materialen en
- 25 Werkwijzen hierboven. De DNA-sequentie van het cDNA dat voor het fosfolipase codeert, wordt in SEQ ID Nr. 1 getoond en de overeenkomstige aminozuursequentie wordt in SEQ ID Nr. 2 getoond. In SEQ ID Nr. 1 definiëren DNA-nucleotiden van nr. 23 tot nr. 1060 het voor fosfolipase coderende gebied. Het gedeelte van de DNA-sequentie in SEQ ID Nr. 1 die voor het volwaardige gedeelte van het fosfolipase
- 30 codeert, omvat posities 113 tot 1060, hetgeen overeenkomt met aminozuurposities 31-346 in SEQ ID Nr. 2.

- [0343] Het cDNA is verkrijgbaar van het plasmide in DSM 11299.

[0344] Totaal-DNA werd uit een gistkolonie geïsoleerd en plasmide-DNA werd gereed door transformatie van *E. coli*, zoals hierboven is beschreven. Teneinde het fosfolipase in *Aspergillus* tot expressie te brengen, werd het DNA met geschikte restrictie-enzymen aan digestie onderworpen, op grootte op gel gefractioneerd, en een fragment dat overeenkomt met het fosfolipase-gen, werd gezuiverd. Het gen werd vervolgens aan pHD414 geligeerd, met geschikte restrictie-enzymen aan digestie onderworpen, waardoor het plasmide A2PH10 werd verkregen.

[0345] Na amplificatie van het DNA in *E. coli* werd het plasmide in *Aspergillus oryzae* getransformeerd, zoals hierboven beschreven is.

10

Test van transformanten van *A. oryzae*

[0346] Elk van de transformanten werd op enzymactiviteit getest, zoals hierboven is beschreven. Sommige van de transformanten bezaten fosfolipase-activiteit die aanzienlijk hoger was dan de achtergrond van *Aspergillus oryzae*. Dit toont de efficiënte expressie van het fosfolipase in *Aspergillus oryzae* aan.

15

Voorbeeld 8

20 Recombinante expressie van een *F. oxysporum*-fosfolipase

[0347] Een transformant van *A. oryzae* die de *Aspergillus*-expressievector pA2PH10 (zie voorbeeld 7) omvat werd gefermenteerd met een gevoede lading zoals hierboven is beschreven. Zuivering van het op recombinante wijze geproduceerde *F. oxysporum*- fosfolipase werd uitgevoerd zoals beschreven is in voorbeeld 2.

25

Voorbeeld 9

Karakterisering van op recombinante wijze tot expressie gebracht en gezuiverd fosfolipase, verkregen van *Fusarium oxysporum*

30

[0348] De karakterisering werd uitgevoerd op een op recombinante wijze tot expressie gebracht en vervolgens gezuiverd *Fusarium-oxysporum*-fosfolipase (zie voorbeeld 8).

[0349] Deze karakteriseringsresultaten met betrekking tot het recombinante *F. oxysporum*-fosfolipase volgens de uitvinding correleren perfect met de in voorbeeld 3 getoonde karakteriseringsresultaten, waarbij werd aangetoond dat het op recombinante wijze tot expressie gebrachte en gezuiverde enzym hetzelfde was als het niet op recombinante wijze tot expressie gebrachte en gezuiverde fosfolipase dat in voorbeeld 3 werd gekarakteriseerd.

10

Algemene bepalingen die zijn gebruikt om een op recombinante wijze geproduceerd fosfolipase, verkregen van *F. oxysporum*, te karakteriseren:

Fosfolipasebepalingen:

15

[0350] Fosfolipase-activiteit (pHLU) werd gemeten als de afgifte van vrije vetzuren van lecithine. 50 µl 4% L-alfa-fosfatidylcholine (plantenlecithine van Avanti, USA), 4% Triton X-100, 5 mM CaCl₂ in 50 mM HEPES, pH 7 werd toegevoegd, 50 µl enzymoplossing werd tot een geschikte concentratie verdund in 50 mM HEPES, pH 7.

20 De monsters werden 10 min. bij 30°C geïncubeerd en de reactie werd op 95°C 5 minuten gestopt voorafgaand aan centrifugatie (5 min. bij 7000 rpm). Vrije vetzuren werden bepaald onder gebruikmaking van de NEFA-C-samenstelling van Wako Chemicals GmbH; 25 µl reactiemengsel werd toegevoegd aan 250 µl reagens A en 10 minuten bij 37°C geïncubeerd. Vervolgens werd 500 µl reagens B toegevoegd en het monster werd opnieuw 10 minuten bij 37°C geïncubeerd. De absorptie bij 550 nm werd 25 gemeten onder gebruikmaking van een HP 8452 spectrofotometer met diodematrix.

Monsters liet men ten minste in tweevoud lopen. Substraat en enzymochermen (voorverwarmede enzymmonsters (10 min. bij 95°C) + substraat) werden opgenomen. Oliezuur werd als een vetzuurstandaard gebruikt. 1 PHLU is gelijk aan de hoeveelheid 30 enzym die in staat is 1 µmol vrij vetzuur/min. onder deze omstandigheden af te geven.

[0351] Als alternatief werd de bepaling uitgevoerd bij 37°C in 20 mM citraatbuffer, pH 5 (Ca²⁺-afhankelijkheid of 20 mM Britton-Robinson-buffer (pH-profiel/temperatuur-profiel/stabiliteit).

- [0352] De fosfolipase-A1-activiteit (PLA1) werd gemeten onder gebruikmaking van 1-(S-decanoyl)-2-decanolyl-1-thio-sn-glycero-3-fosfocholine (D3761 Molecular Probes) als een substraat. 190 µl substraat (100 µl D3761 (2 mg/ml in ethanol) + 50 µl 1% Triton X-100 + 1,85 ml 50 mM HEPES, 0,3 mM DTNB, 2mM CaCl₂, pH 7) in een 200-µl-cuvette werden toegevoegd aan 10 µl enzym en de absorptie bij 410 nm werd bij kamertemperatuur als een functie van tijd op de HP 8452A spectrofotometer met diodematrix gemeten. De activiteit werd berekend als de helling van de kromme in het lineaire gebied. PLA1 is gelijk aan de hoeveelheid enzym die in staat is 1 µmol van het vrije zuur (thiol)/min. onder deze omstandigheden af te geven.
- 10 Fosfolipase-A2-activiteit (PLA2) werd bij 40°C gemeten onder gebruikmaking van 1-hexadecanoyl-2-(1-pyreendecanoyl)-sn-glycero-3-fosfocholine (H361 Molecular Probes). 2 ml substraat (50 µl 1% Triton X-100 + 25 µl 0,1% H361 in methanol + 10 ml 50 mM HEPES, pH 7) in een 2-ml-cuvette werd onder roeren toegevoegd aan 10 µl enzym, en de pyreenfluorescentie-emissie werd gemeten bij 376 nm (excitatie bij 340 nm) als een functie van tijd (tussenpozen van 1 sec.) onder gebruikmaking van het Perkin-Elmer-LS50-apparaat. In de Triton-X-100/fosfolipidemicellen werd de concentratie fosfolipide ingesteld voor het verkrijgen van excimeervorming (emitteert bij 480 nm). Na splitsing wordt het vetzuur in de 2-positie dat de pyreengroep bevat, vrijgemaakt in de waterige fase die een toename in de monomeeremissie tot gevolg heeft. PLA2 werd genomen als de helling van de kromme in het lineaire gebied onder
- 20 gelijke omstandigheden.

Lipasebepalingen:

- 25 [0353] De lipase-activiteit (LU) werd gemeten volgens de publicatie AF 95 van Novo Nordisk. De hydrolyse van tributyrine bij 30°C bij een pH van 7 werd gevolgd in een pH-stat-titratie-experiment. 1 LU is gelijk aan de hoeveelheid enzym die in staat is 1 µmol boterzuur/min. onder standaardomstandigheden vrij te maken.
- [0354] De activiteit op olijfolie (SLU) werd als volgt gemeten: 12 ml 5 mM Tris-HCl, 40 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 9, werd toegevoegd aan 2,5 ml Sigma Lipase Substraat. De pH werd ingesteld op een pH van 9 of juist daaronder, voorafgaand aan het toevoegen van 0,5 ml lipase-oplossing (verdund in buffer) en het uitvoeren van een pH-stat-titratiebepaling bij 30°C onder gebruikmaking van het Titralab, een product van
- 30

Radiometer A/S, Kopenhagen, Denemarken. 1 SLU is gelijk aan de hoeveelheid enzym die in staat is 1 μmol vrij vetzuur/min. bij een pH van 9, en bij 30°C vrij te maken.

Karakterisering van op recombinante wijze geproduceerd *F.-oxysporum*-fosfolipase volgens de uitvinding

5

[0355] De bepalingen die zijn gebruikt om de hierna genoemde enzymen te karakteriseren, waren de bepalingen die onmiddellijk hierboven beschreven zijn.

10 Enzymen:

[0356] PL van *Fusarium oxysporum* met de in SEQ Nr. 2 getoonde aminozuursequentie.

Lading F-9700989, OD₂₈₀ 0,83 (0,69 mg/ml), zuiverheid > 95% (SDS-PAGE).

15 Het enzym werd op recombinante wijze tot expressie gebracht en gezuiverd, zoals hierboven is beschreven.

LecitaseTM Lading L546-F06 IU/ml, ongeveer 20 mg/ml).

Lipolase® (Novo Nordisk A/S).

[0357] De invloed van Ca²⁺ op de fosfolipase-activiteit van het *F.-oxysporum*-
20 lipase/fosfolipase werd onderzocht. Er werd geen belangrijk verschil waargenomen, ongeacht of EDTA of Ca²⁺ al dan niet in de bepaling werd opgenomen (zie tabel 3. hierna) en aldus blijkt het enzym betrekkelijk onafhankelijk van Ca²⁺ te zijn.

25

30

Tabel 3

| <i>F. oxysporum</i> fosfolipase-activiteit (PHLU) afhankelijkheid van EDTA en CaCl ₂ - 2% Lecithine, 2% Triton X-100, 20 mM citraat, pH 5 bij 37°C. | | | | | | |
|--|----------|-----------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| | 5mM EDTA | 1 mM EDTA | 1mM CaCl ₂ | 2mM CaCl ₂ | 5 mM CaCl ₂ | 10 mM CaCl ₂ |
| Relatieve activiteit ¹ | 1,05 | 1,10 | 1 | 0,90 | 0,90 | 0,89 |

¹ Relatieve activiteit is relatief ten opzichte van de activiteit bij 1 mM CaCl₂, die tot 1 is genormaliseerd.

- 5 [0358] Het pH-profiel werd in Britton-Robinson-buffer onderzocht onder gebruikmaking van plantenlecithine als een substraat (tabel 4). Hoewel de enzymen een alkalisch pH-profiel op fosfolipide vertonen met een optimum bij pH 9 of hoger, is de activiteit nog steeds voldoende hoog om ontgoming van oliën met een lage pH en een prestatie bij het bakken te verschaffen (zie hierna voor een vergelijking van specifieke
- 10 activiteiten).

Tabel 4

| <i>Fusarium oxysporum</i> fosfolipase-pH-profiel 2% Lecithine, 2% Triton X-100, 20 mM BR, 37°C. | | | | | | | |
|---|------|------|------|------|------|------|------|
| | pH 3 | pH 4 | pH 5 | pH 6 | pH 7 | pH 8 | pH 9 |
| Relatieve activiteit ¹ | 0,08 | 0,12 | 0,16 | 0,28 | 0,52 | 0,76 | 1,00 |

¹ Relatieve activiteit is relatief ten opzichte van de activiteit bij pH 9, die tot 1 is genormaliseerd.

- 15 [0359] Temperatuurprofielen voor het fosfolipase werden verkregen bij een pH van 5; de activiteit begint te verminderen bij een temperatuur boven 40°C (tabel 5). Dit is in redelijke overeenstemming met de temperatuurstabiliteit die gemeten werd door pre-incubatie van het enzym en het vervolgens meten van de resterende activiteit (tabel
- 20 6), waarbij het enzym stabiel is bij temperaturen tot 45°C bij een pH van 5.

Tabel 5

| <i>F. oxysporum</i> fosfolipasetemperatuurprofiel 2% Lecithine, 2 % Triton X-100, 20 mM BR. | | | | | |
|---|------|------|------|------|------|
| | 30°C | 40°C | 45°C | 50°C | 55°C |
| pH 5 | 0,85 | 1,00 | 0,67 | 0,38 | 0,13 |

Alle gegevens zijn als relatieve activiteitsgegevens getoond, met betrekking tot de activiteit bij een pH van 5, 40°C, die tot 1 is genormaliseerd.

5

Tabel 6

| Temperatuurstabiliteit van <i>F. oxysporum</i> fosfolipase; pre-incubatie 30 min. in 20 mM BR | | | | | | |
|---|------|------|------|------|------|------|
| | 5°C | 30°C | 40°C | 45°C | 50°C | 55°C |
| pH 5 | 1,00 | 0,91 | 1,03 | 1,07 | 0,65 | 0,00 |

Alle gegevens zijn als restactiviteitgegevens getoond, waarbij de activiteit na pre-incubatie bij 5°C tot 1 is genormaliseerd.

- 10 [0360] De lage stabiliteit van het enzym is waarschijnlijk voordelig om een mogelijk product als een werkwijzehulpmiddel vast te stellen, aangezien het actieve enzym naar men aanneemt niet in het eindproduct van de ontgomming van eetbare oliën of in gebakken producten aanwezig zal zijn.
- [0361] Het van *Fusarium oxysporum* verkregen fosfolipase volgens de uitvinding
- 15 bezit zowel fosfolipase-activiteit als lipase-activiteit.
- [0362] Dienovereenkomstig werd de activiteit van het enzym op verschillende lipase- en fosfolipasesubstraten onderzocht en werd vergeleken met de activiteit van het in de handel verkrijgbare fosfolipase Lecitase™ en met het in de handel verkrijgbare lipase Lipolase® (Novo Nordisk A/S).
- 20 [0363] Het fosfolipase/lipase van *F. oxysporum* bezit een hoge activiteit op zowel tributyrine als op olijfolie met een pH van 7 en 9 (tabel 7). Voor vergelijkingsdoeleinden is de specifieke activiteit van Lipolase® ongeveer 5000 LU/mg. Echter, in tegenstelling tot Lipolase® bezit het lipase van *F. oxysporum* een veel bredere specificiteit met aanzienlijke fosfolipase-activiteit en eveneens

thioesterase-activiteit (zie monolaagvoorbeeld 6 hierboven, dat laat zien dat Lipolase® geen meetbare fosfolipase-activiteit bezit).

[0364] Het fosfolipase/lipase van *F. oxysporum* volgens de uitvinding heeft een specifieke activiteit op lecithine die aanzienlijk hoger is dan die van het fosfolipase

5 Lecitase™ (PLA2 van varkenspancreas) bij een pH van 7 (tabel 7).

[0365] In vergelijking met Lecitase™ bezit het enzym van *F. oxysporum* een honderdvoudig hogere activiteit bij een pH van 7. De verhouding van fosfolipase:lipase voor het enzym van *F. oxysporum* is ongeveer 0,225 (1000 LU/mg / 225 PHLU/mg) onder vrijwel gelijke omstandigheden (pH en 30°C).

10

Tabel 7

| Activiteit van het <i>F. oxysporum</i> lipase/fosfolipase - vergelijking met Lecitase™ | | | | | |
|--|--------|----------------------|---------|--------|---------|
| Enzym | LU/mg | PLU ¹ /mg | PHLU/mg | SLU/mg | PLA1/mg |
| <i>F. oxysporum</i> | 1000 | 73 | 225 | 3090 | 2,04 |
| Lecitase | < 0,25 | 5,5 | 1,2-3,2 | 0,6 | 0 |

¹PLU werd zoals PHLU gemeten, maar in 20 mM citraat, pH 5 en bij 37°C in plaats van 50 mM HEPES, pH 7 bij 30°C.

15 [0366] De specificiteit van het lipase/fosfolipase van *F. oxysporum* werd onderzocht onder gebruikmaking van substraten die specifiek zijn voor fosfolipase A1; meting van de splitsing van de thioesterbinding in de 1-positie van 1-(S-decanoyl)-2-decanoyl-1-thio-sn-glycero-3-fosfocholine.

[0367] Het enzym hydrolyseert duidelijk de 1-positie in fosfolipide (tabel 7),

20 terwijl Lecitase™ (PLA2 van varkenspancreas) zoals werd verwacht, geen activiteit op dit substraat vertoonde.

C-eindstandige aminozuursequentie van het fosfolipase volgens de uitvinding van *Fusarium oxysporum*

25

[0368] De N-eindstandige aminozuursequentie van het op recombinante wijze tot expressie gebrachte volwaardige fosfolipase-eiwit werd bepaald zoals beschreven is in voorbeeld 3, en van deze N-eindstandige sequentie werd bevestigd dat deze hetzelfde is als werd bepaald voor het volgens niet-recombinante wijze geproduceerde en

30 gezuiverde enzym (zie voorbeeld 3).

[0369] MALDI-TOF-massaspectrometrie werd uitgevoerd onder gebruikmaking van een VG-TofSpec-massaspectrometer (Micromass, Manchester, UK) zoals beschreven is door Christgau et al., Biochem. J., 319, 705-712, 1996.

5 Achtergrond

[0370] De N-eindstandige aminozuursequentie van het fosfolipase van *Fusarium oxysporum*, zoals werd afgeleid van de DNA-sequentie, voorziet in combinatie met de bekende N-eindstandige aminozuursequentie van het volwaardige fosfolipase in een
10 eiwit van 315 aminozuurresten (aminozuren 31-346 in SEQ ID Nr. 2). De theoretische massa van dit voorspelde eiwit is 33.256,8 Da.

[0371] Onder toepassing van MALDI-TOF-massaspectrometrie hebben we eerder bepaald dat de massa van het authentieke lipase/fosfolipase van *F. oxysporum* 28,2 kDa moet zijn (gegevens niet getoond), en op SDS-PAGE werd getoond dat het
15 molecuulgewicht 29-30 kDa is (zie hierboven).

[0372] Aangezien de N-eindstandige aminozuursequenties van de authentieke en de recombinante lipasen van *F. oxysporum* identiek zijn, is het waarschijnlijk dat het massaverschil tussen de voorspelde massa en de experimentele massa door C-eindstandige verwerking wordt veroorzaakt.

20 [0373] Om dit te onderzoeken hebben we het C-eindstandige peptide van het recombinante lipase van *F. oxysporum* dat in *A. oryzae* tot expressie is gebracht, geïsoleerd en de sequentie ervan is door het C-uiteinde ervan bepaald.

Werkwijze

25

[0374] De gemiddelde massa van het authentieke lipase/fosfolipase van *F. oxysporum* van 28,2 kDa kan worden gebruikt om de meest waarschijnlijke C-eindstandige rest te bepalen die Ser303 (SEQ ID Nr. 2) blijkt te zijn.

[0375] Deze afleiding is gebaseerd op de veronderstelling dat het enzym niet geglycosyleerd is. De enkele mogelijke N-glycosyleringsplaats die in de sequentie op
30 Asn163 wordt aangetroffen, wordt waarschijnlijk niet gebruikt, aangezien een Pro-rest op positie 164 wordt aangetroffen. De aanwezigheid van een Pro-rest als de tweede rest in de consensussequentie voor N-glycosylering (Asn-Xaa-Ser/Thr) is nooit vermeld.

[0376] Inspectie van SEQ ID.Nr. 2 (zie hierna) laat zien dat het voorspelde C-uiteinde zich dichtbij de laatste van de 8 Cys-resten in de sequentie bevindt. Inbrenging van een radioactief merkmiddel op de Cys-resten maakt het mogelijk dat de peptiden die de Cys-resten bevatten, gemakkelijk door peptidezuivering kunnen worden getraceerd. Combineren van radioactief merken met proteolytische afbraak onder gebruikmaking van het Asp-N-protease dat voor Asp-resten splitst, moet een gemerkt C-eindstandig peptide geven. Daarnaast kunnen 3 inwendige peptiden worden gemerkt. Sequentiebepaling van alle gemerkte peptiden moeten het C-uiteinde van het enzym aantonen.

346

SEQ ID Nr. 2: Voorspelde aminozuursequentie van het lipase/fosfolipase van *F. oxysporum*

- [0377] De sequentie wordt afgeleid van de DNA-sequentie en begint op het N-
 5 uiteinde, experimenteel bepaald voor zowel het authentieke als het recombinante
 enzym. De 8 Cys-resten worden door ↓ aangegeven, terwijl de C-eindstandige Ser-rest
 die wordt voorspeld aan de hand van de MALDI-TOF-massaspectrometrie van het
 authentieke enzym door ↑ wordt aangegeven. De Asn-rest die in de consensussequentie
 voor N-glycosylering (NXS/T) wordt aangetroffen, wordt bij (Ø) getoond, maar wordt
 10 naar alle waarschijnlijkheid niet gebruikt als X een Pro-rest is.

Experimentele resultaten

- [0378] Het enzym was PL van *Fusarium oxysporum* dat de in SEQ Nr. 2 getoonde
 15 aminozuursequentie bezit.
- [0379] Lading F-9700989, OD₂₈₀ 0,83 (0,69 mg/ml), zuiverheid >95% (SDS-
 PAGE).
- [0380] Het enzym werd op recombinante wijze tot expressie gebracht en gezuiverd
 zoals hierboven is beschreven.
- 20 [0381] Het enzym werd gedenateerd en de bisulfidebindingen werden
 gereduceerd voordat men de thiolgroepen liet reageren met I[1-¹⁴C]CH₂CONH₂.
- [0382] Na het radioactieve merken van de Cys-resten werd het lipase afgebroken
 onder gebruikmaking van het Asp-N-protease.
- [0383] De verkregen peptiden werden gefractioneerd onder gebruikmaking van
 25 HPLC met omgekeerde fase. De verzamelde fracties werden onderworpen aan
 MALDI-TOF-massaspectrometrie en scintillatietelling. Fracties die aanzienlijke
 hoeveelheden radioactiviteit bevatten, werden gekozen voor het opnieuw zuiveren
 onder toepassing van HPLC met omgekeerde fase.
- [0384] De opnieuw gezuiverde fracties werden onderworpen aan scintillatietelling
 30 en van de fracties die radioactiviteit bevatten, werd vervolgens de sequentie bepaald.
- [0385] Hierna wordt een samenvatting van de resultaten gegeven. Dit schema kan
 er chaotisch uitzien als gevolg van de vele vermelde sequenties. Echter, het schema
 bevat alle sequentiegegevens die van de radioactieve fracties werden verkregen, en

derhalve omvat het de basis voor de getrokken conclusie. Opgemerkt wordt dat alle Cys-resten door de sequentie bepaling zijn omvat; de meeste ervan meer dan eenmaal. Iets anders om op te merken is de waargenomen afwijkende splitsingen die een groot aantal kleine radioactief gemerkte peptiden tot gevolg hebben.

5

↓ ↓ ↓

NG CPT
NNG CPTVQ
CSN
CSNNG CP
CSNNG CPTV

10

CNSEAAA GSKI

31 AVGVTTTDFS NFKFYIQHGA AAYCNSEAAA GSKITCSNNG CPTVQNGAT 80

↓

DCS
DCS

15

81 IVTSFVGSKT GIGGYVATDS ARKEIVVSFR GSINIRNWL T NLD FGQEDCS 130

↓

LVSGC
LVSGCGVHSG FQRAW

131 LVSGCGVHSG FQRAWNEISS QATAAVASAR KANPSFNVIS TGHS LGGAVA 180

20

181 VLAAANLRVG GTPVDIYTYG SPRVGNAQLS AFVSNQAGGE YRVTHADDPV 230

↓ ↓

DVKVCEG
DVKVCEGA ANLGCNNGTL
DVKVCEGA ANLGCNNGTL

25

231 PRLPPLIFGY RHTTPEFWLS GGGGDKVDYT ISDVKVCEGA ANLGCNNGTL 280

↓

DACNAG GFS
GL TDACNAG GF

30

281 GLDIAAHLHY FQATDACNAG GFSWRRYRSA ESVDK RATMT DAELEKKLNS 330

↑

331 YVQMDKEYVK NNQARS

346

5

[0386] De aminozuursequenties werden verkregen door sequentiebepaling van de
 10 radioactief gemerkte peptiden die zijn afgeleid van het recombinante enzym van *F.*
oxysporum. De sequenties zijn gerangschikt met de voorspelde aminozuursequentie
 zoals werd afgeleid van de DNA-sequentie. De 8 Cys-resten worden door ↓
 aangegeven, terwijl de C-eindstandige Ser-rest die wordt voorspeld aan de hand van de
 MALDI-TOF-massaspectrometrie van het authentieke enzym, door ↑ wordt
 15 aangegeven.

Conclusie van het experiment

[0387] Aan de hand van de sequentiebepaling van de radioactief gemerkte
 20 peptiden is het duidelijk dat het C-eindstandige gedeelte van de gecodeerde
 aminozuursequentie in het DNA wordt verwerkt tijdens de expressie van het lipase van
F. oxysporum. De peptidesequenties wijzen naar Ser 303 als de meest waarschijnlijke
 C-eindstandige rest in het volwaardige enzym volgens het resultaat van de MALDI-
 TOF-massaspectrometrie.

[0388] Op grond van de gegevens kan echter niet worden uitgesloten dat
 25 differentiële C-eindstandige verwerking optreedt die tot heterogene C-uiteinden leidt;
 b.v. één peptide geeft aan dat PHE272 eveneens als een C-eindstandige rest kan worden
 aangetroffen.

30 Voorbeeld 10

Algemene beschrijving van de bepaling voor enzymatische ontgoming van eetbare olie

EU 0 869 167 B1

Uitrusting voor het uitvoeren van enzymatische ontgoming

- [0389] De uitrusting bestaat uit een 1 l reactor met stalen omhulling die is uitgerust met een stalen deksel, een propeller (600 rpm), schotten, een temperatuursensor, een inlaatbuis aan de bovenkant, een refluxcondenser (4°C) aan de bovenkant en een uitlaatbuis aan de onderkant. De reactoromhulling is met een thermostaatbad verbonden. De uitlaatbuis is via een siliconenbuiswerk verbonden met een Silverson in-lijn menginrichtingkop die is uitgerust met een "zeef met vierkante gaten en een hoge afschuiving", aangedreven door een Silverson L4RT laboratoriummenginrichting met hoge afschuiving (8500 rpm, debiet ongeveer 1,1 l/min.). De menginrichtingkop is uitgerust met een koelspiraal (5-10°C) en een uitlaatbuis die door middel van een siliconenbuiswerk met de inlaatbuis van de reactor is verbonden. Een temperatuursensor wordt in het siliconenbuiswerk ingevoegd juist na de menginrichtingkop. De enige verbinding van het reactor/menginrichting-kopsysteem met de atmosfeer is door middel van de refluxcondenser.

Algemene werkwijze voor het uitvoeren van enzymatische ontgoming

- [0390] Alle koeluitrusting en thermostaatuitrusting wordt aangezet. Vervolgens wordt 0,6 l (circa 560 g) olie in de reactor gebracht, die op ongeveer de temperatuur die voor het specifieke experiment nodig is, wordt gehouden. De laboratoriummenginrichting wordt aangezet, waardoor de olie van de reactor naar de menginrichtingkop en terug naar de reactor begint te circuleren. Men laat het systeem ongeveer 10 minuten in evenwicht komen, tijdens welk tijdsbestek de temperatuur fijn wordt afgesteld. De periode van voorbehandeling begint met het toevoegen van 0,6 g (2,86 mmol) citroenzuurmonohydraat in 27 g MilliQ water (toegevoegd water ten opzichte van olie is gelijk aan 4,8% gew./gew.; [citroenzuur] in waterfase = 106 mM, in water/olie-emulsie = 4,6 mM) waarbij $t = 0$ wordt ingesteld. Als $t = 30$ minuten, wordt een geschikte hoeveelheid 4 M NaOH-oplossing toegevoegd.

0,0 equiv. 4 M NaOH \rightarrow pH 3,7

1,0 equiv. 4 M NaOH (0,714 ml) \rightarrow pH 4,5

1,5 equiv. 4 M NaOH (1,07 ml) → pH 5,0
 2,0 equiv. 4 M NaOH (1,43 ml) → pH 5,5
 2,5 equiv. 4 M NaOH (1,79 ml) → pH 6,2
 3,0 equiv. 4 M NaOH (2,14 ml) → pH 8,0

5

[0391] Als $t = 35$ minuten, worden monsters voor P-analyse en pH-bepaling getrokken. Juist hierna wordt de vereiste hoeveelheid enzymoplossing toegevoegd (einde van voorbehandelingsperiode). Monsters voor P-analyse en pH-bepaling worden getrokken als $t = 1, 2, 3, 5, 5$ en 6 uur, en vervolgens wordt de reactie gestopt.

- 10 [0392] Het reactor/menginrichtingssysteem wordt geledigd en schoongespoeld met 2 x 500 ml 10% Deconex/DI wateroplossing, gevolgd door minimaal 3 x 500 ml DI water. Tabel 8 is een weergave van de verschillende toevoegingen en monstertrekkingen tijdens de reactie.

15

Tabel 8

| Schema voor enzymatische ontgoming | | | |
|------------------------------------|----------------|-------------|-------------|
| Tijd | Toevoeging van | Bemonsteren | |
| | | P-analyse | pH-bepaling |
| | | X | |
| 0 | Citroenzuur | | |
| 5 min. | | | X |
| 30 min. | | X | X |
| 30 + 8 min. | NaOH | | |
| 35 min. | | X | X |
| 35 + 8 min. | Enzym | | |
| 1 uur | | X | X |
| 2 uur | | X | X |
| 3,5 uur | | X | X |
| 5 uur | | X | X |
| 6 uur | | X | X |

Fosforanalyse:

EU 0 869 167 B1

Bemonsteren voor P-analyse

[0393] Neem 10 ml water-in-olie-emulsie in een glazen centrifugebuis. Verwarm
 5 de emulsie 30 minuten in een kokend waterbad. Centrifugeer 10 minuten bij 5000 rpm.
 Breng ongeveer 8 ml van de bovenste (olie) fase over naar een 12 ml polystyreenbuis
 en laat het 12-24 uur staan (om te bezinken). Onttrek na het bezinken ongeveer 1-2 g
 van de bovenste heldere fase voor T-analyse.

[0394] P-analyse werd uitgevoerd volgens het voorschrift 2.421 in "Standard
 10 Methods for the Analysis of Oils, Fats, and Derivatives, 7th ed. (1987)";

[0395] Weeg 100 mg MgO (licht, Merck #5862) in een porseleinen schaalje en
 verwarm met een gasbrander. Voeg 1-2 g olie toe en brand met een gasbrander voor het
 verkrijgen van een zwarte harde massa. Verhit 2 uur op 850°C in een Vecstar-fornuis
 voor het verkrijgen van witte as. Los de as op in 5 ml 6M HNO₃ en voeg 20 ml
 15 reagensmengsel toe. Laat dit 20 minuten staan. Meet de absorptie bij 460 nm (gebruik
 een blanco (5 ml HNO₃ plus 20 ml reagensmengsel) voor nul-toevoeging). Bereken
 door de calibratiekromme te gebruiken.

pH-bepaling

20

[0396] Breng 2 ml van een water-in-olie-emulsie en meng dit met 2 ml MilliQ
 water. Pipetteer na fasescheiding de bovenste olielaag weg. Meet de pH in de waterfase
 met pH-elektrode Orion. Metingen worden omgezet naar "werkelijke pH-waarden"
 volgens de formule

25

$$\text{pH}_{\text{werkelijk}} = \text{pH}_{\text{gemeten}} - 0,38$$

[0397] Een calibratiekromme werd verkregen door het oplossen van 0,6
 citroenzuurmonohydraat in 27 g DI water; de pH van deze oplossing werd door pH-
 30 elektrode Orion gemeten (pH_{werkelijk}). 100 µl werd gemengd met 2 ml MilliQ water, en
 de pH van deze oplossing werd door pH-elektrode Orion gemeten (pH_{gemeten}). De pH
 van de citroenzuuroplossing werd geleidelijk veranderd door het toevoegen van een

NaOH-oplossing, en voor elke toevoeging werden verdunnings- en pH-metingen uitgevoerd, zoals hierboven is beschreven.

Voorbeeld 11

5

Optimale ontgommingsomstandigheden voor Lecitase™

[0398] Alle experimenten betreffende de ontgoming van eetbare olie werden uitgevoerd zoals in voorbeeld 10 is beschreven.

10

Olie:

[0399] Met water ontgomde raapzaadolie (Colzro) van Aarhus Oliefabrik, Denemarken.

15 Lading C00730/B01200, 9 kg, P-gehalte 186 ppm (0,47% fosfatide)

De olie is een niet in de handel verkrijgbaar product, maar wordt direct van de productielijn bij de molen afgenomen.

Enzym:

20

Lecitase™ 10 l

[0400] Lading L646-F02 (10190 E/ml), geschatte conc. 20 mg/ml.

[0401] De specifieke omstandigheden voor een reeks van parameteroptimalisatie-experimenten met Lecitase™ worden in tabel 9 gegeven. De standaardomstandigheden zijn: enzymdosering 535 E/kg olie, (1,1 mg/kg olie), 60°C, 2,0 eq. NaOH (pH 5,5). De enzymdosering is gevarieerd van 268-1070 E/kg olie, de temperatuur is gevarieerd van 40-70°C, en NaOH-toevoeging is gevarieerd van 1,0-3,0 eq. overeenkomend met de verschillende pH-niveaus zoals in tabel 9 is getoond.

30

Tabel 9

| Specifieke omstandigheden voor Lecitase™-optimalisatie | | | | | |
|--|--------------|-----------|----------|------------|---------------------------|
| Experiment # | Raapzaadolie | Temp (°C) | Eq. NaOH | pH niveau* | Enzymdosering (U/kg olie) |
| 10 | Colzro 1200 | 60°C | 2,0 | 5,5 | 0 (<i>blanco</i>) |
| 21 | Colzro 1208 | 60°C | 0,0 | 3,7 | 0 (<i>blanco</i>) |
| 8 | Colzro 1200 | 60°C | 2,0 | 5,5 | 535 |
| 9 | Colzro 1200 | 60°C | 2,0 | 5,5 | 535 |
| 11 | Colzro 1200 | 60°C | 2,0 | 5,5 | 268 |
| 12 | Colzro 1200 | 60°C | 2,0 | 5,5 | 1070 |
| 15 | Colzro 1200 | 70°C | 2,0 | 5,5 | 535 |
| 17 | Colzro 1200 | 50°C | 2,0 | 5,5 | 535 |
| 18 | Colzro 1200 | 40°C | 2,0 | 5,5 | 535 |
| 19 | Colzro 1200 | 60°C | 1,0 | 4,5 | 535 |
| 40 | Colzro 1209 | 60°C | 1,5 | 5,0 | 535 |
| 44 | Colzro 1429 | 60°C | 2,5 | 7,0 | 535 |
| 20 | Colzro 1200 | 60°C | 3,0 | 8,0 | 535 |

*pH van t = 35min.-6uur. Binnen dit tijdsbestek waren alle pH-vaststellingen binnen een nauw gebied. Dit wordt hieronder verder geïllustreerd in voorbeeld 13.

5 [0402] Presentaties van de afzonderlijke optimalisatie-onderzoekingen worden in tabel 10 gegeven.

[0403] De resultaten in tabel 10 laten het volgende zien.

- 10 (i) Uit het dosering/reactie-onderzoek blijkt dat de optimale enzymdosering (bij 60°C en 2,0 eq. NaOH) ongeveer 535 E/kg olie is. Een halve dosering verhoogt de ontgommings tijd van ongeveer 3,5 uur tot 6 uur, en dubbele dosering geeft geen enkele verandering in de ontgommingsprestatie. De resultaten zonder enzym zijn ingevoegd voor vergelijking;
- 15 (ii) De optimale temperatuur is ongeveer 60°C, aangezien 70°C het P-niveau niet volledig omlaag brengt, 50°C de ontgommings tijd ongeveer 3,5 tot 6 uur verhoogt en 40°C een slechte prestatie geeft.

Tabel 10

| Resultaten van optimalisatie van Lecitase™ -ontgommingsomstandigheden | | | | | | | | |
|---|---------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Vb. # | Tijd ¹ 0 | Tijd ¹ 0,50 | Tijd ¹ 0,58 | Tijd ¹ 1,0 | Tijd ¹ 2,0 | Tijd ¹ 3,5 | Tijd ¹ 5,0 | Tijd ¹ 6,0 |
| 10 | 160 | 140 | 116 | 118 | 108 | 109 | 105 | 109 |
| 21 | 178 | 149 | - | 143 | 142 | 143 | 147 | 154 |
| 8 | 164 | 139 | 117 | 85 | 30 | - | 2 | 3 |
| 9 | 164 | 136 | 109 | 79 | 14 | 4 | 3 | 4 |
| 11 | 183 | 149 | 123 | 104 | 78 | 35 | 10 | 7 |
| 12 | 165 | 131 | 117 | 71 | 13 | 3 | 4 | 3 |
| 15 | 170 | 139 | 127 | 83 | 23 | 10 | 11 | 9 |
| 17 | 162 | 134 | 127 | 95 | 56 | 15 | 11 | 5 |
| 18 | 176 | 151 | 136 | 10 | 66 | 28 | 24 | 28 |
| 19 | 171 | 139 | 147 | 142 | 142 | 118 | 91 | 80 |
| 40 | 184 | 149 | 157 | 126 | 109 | 73 | 40 | 30 |
| 44 | 226 | 202 | 197 | 148 | 99 | 66 | 40 | 34 |
| 20 | 165 | 136 | 111 | 102 | 90 | 81 | 73 | 72 |

¹Fosforgehalte (ppm) in oliephase op aangegeven tijden in uren.

Voorbeeld 12

5

Optimale ontgommingsomstandigheden voor een *Fusarium oxysporum* fosfolipase volgens de uitvinding

[0404] Alle experimenten van enzymatische ontgomming van eetbare olie werden
10 uitgevoerd zoals beschreven is in voorbeeld 10.

Olie:

[0405]

Met water ontgomde raapzaadolie (Colzro) van Aarhus Oliefabrik, Denemarken.
15 Lading C00730/B01208, P-gehalte ongeveer 200 ppm
Lading C00730/B01209, P-gehalte ongeveer 200 ppm
Lading C00730/B01429, P-gehalte 227 ppm

EU 0 869 167 B1

Lading C00730/B01430, P-gehalte 252 ppm

Deze oliën zijn niet in de handel verkrijgbaar, maar direct van de productielijn bij de molen afgenomen.

5

Enzym:

[0406]

PL van *Fusarium oxysporum* met de in SEQ Nr. 2 getoonde aminozuursequentie.

Lading F-9700123, OD₂₈₀ 1,48, zuiverheid ongeveer 58%, geschatte conc. 0,9

10

mg/ml.

[0407] Het enzym werd op recombinante wijze tot expressie gebracht en gezuiverd zoals hierboven is beschreven.

[0408] De specifieke omstandigheden voor een reeks parameteroptimalisatie-

15

experimenten met PL van *Fusarium oxysporum* worden in tabel 11 vermeld. Standaard omstandigheden zijn: enzymdosering 1,6 mg/kl olie, 40°C, 1,5 eq. NaOH (pH ongeveer 5,0). De enzymdosering is gevarieerd van 0,2-1,6 mg/kg olie, de temperatuur is gevarieerd van 30-50°C en de NaOH-toevoeging is gevarieerd van 1,0-2,5 eq. overeenkomend met de verschillende pH-niveaus zoals in tabel 11 is getoond.

20

25

30

Tabel 11

| Specifieke omstandigheden voor optimalisatie van PL van <i>Fusarium oxysporum</i> | | | | | |
|---|-------------------|-----------|----------|-----------|-------------------------------|
| Experiment # | Raapzaad- olie | Temp (°C) | Eq. NaOH | pH niveau | Enzymdosering (mg/kg olie) |
| 31 | Colzro 1208 | 40°C | 1,5 | 5,0 | 1,6 |
| 53 | Colzro 1429 | 40°C | 1,5 | 5,3 | 1,6 |
| 33 | Colzro 1209 | 40°C | 1,5 | 5,0 | 0,8 |
| 35 | Colzro 1209 | 40°C | 1,5 | 5,0 | 0,4 |
| 36 | Colzro 1209 | 40°C | 1,5 | 5,0 | 0,2 |
| 38 | Colzro 1209 | 50°C | 1,5 | 5,0 | 1,6 |
| 64 | Colzro 1430 | 45°C | 1,5 | 5,0 | 1,6 |
| 39 | Colzro 1209 | 30°C | 1,5 | 5,0 | 1,6 |
| 32 | Colzro 1209 | 40°C | 1,0 | 3,5 | 1,6 |
| 13 | Colzro 1209 | 40°C | 1,0 | 4,5 | 1,6 |
| 45 | Colzro 1429 | 40°C | 1,25 | 5,0 | 1,6 |
| 46 | Colzro 1429 | 40°C | 1,75 | 5,5 | 1,6 |
| 34 | Colzro 1209 | 40°C | 2,0 | 5,5 | 1,6 |
| 37 | Colzro 1209 | 40°C | 2,5 | 6,2 | 1,6 |

[0409] De experimentresultaten worden in tabel 12 hierna vermeld. De pH-afwijkingen binnen het tijdsbestek van 35 mm. – 6 uur vallen alle binnen de verwachte intervallen met slechts geringe onregelmatigheden.

[0410] Samengevat laten de resultaten in tabel 12 hierna het volgende zien:

5

(i) uit de dosering/reactietests blijkt dat de optimale enzymdosering (bij 40°C en 1,5 eq. NaOH) ongeveer 0,8 mg/kg olie is;

(ii) de optimale NaOH-toevoeging is ongeveer 1,5 eq. (pH ongeveer 5,0), zonder prestatie bij 1,0 eq. (pH ongeveer 4,5), en met een beperkte prestatie bij 2,0 eq. (pH ongeveer 5,5) en 2,5 eq. (pH ongeveer 6,2); en

10

(iii) De optimale temperatuur is ongeveer 45°C en 50°C geeft een beperkte prestatie.

15

20

25

30

Tabel 12

| Resultaten van de optimalisatie van <i>Fusarium oxysporum</i> ontgommingsomstandigheden | | | | | | | | |
|---|---------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Ex # | Tijd ¹ 0 | Tijd ¹ 0,50 | Tijd ¹ 0,58 | Tijd ¹ 1,0 | Tijd ¹ 2,0 | Tijd ¹ 3,5 | Tijd ¹ 5,0 | Tijd ¹ 6,0 |
| 31 | 169 | 130 | 136 | 15 | 8 | 7 | 8 | 7 |
| 53 | 232 | 203 | 208 | 32 | 10 | 7 | 7 | 4 |
| 33 | 188 | 156 | 160 | 27 | 7 | 6 | 6 | 8 |
| 35 | 181 | 153 | 153 | 89 | 5 | 5 | 4 | 6 |
| 36 | 187 | 162 | 157 | 117 | 61 | 32 | 20 | 15 |
| 38 | 187 | 149 | 146 | 84 | 83 | 68 | 58 | 55 |
| 64 | 151 | 192 | 201 | 10 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 39 | 184 | 163 | 158 | 36 | 7 | 7 | 9 | 9 |
| 32 | 167 | 137 | 165 | 152 | 146 | 151 | 148 | 146 |
| 13 | 170 | 140 | 141 | 140 | 133 | 126 | 130 | 131 |
| 45 | 221 | 189 | 195 | 161 | 118 | 99 | 92 | 95 |
| 46 | 225 | 187 | 163 | 93 | 4 | 7 | 6 | 15 |
| 34 | 189 | 174 | 165 | 61 | 27 | 25 | 26 | 19 |
| 37 | 205 | 168 | 157 | 88 | 22 | 23 | 20 | 21 |

¹ Fosforgehalte (ppm) in oliefase op aangegeven tijden in uren.

Voorbeeld 13

5

Illustratie van standaard-pH-afwijkingen tijdens een enzymatisch ontgommingswerkwijze

10 [0411] De tabel 13 hierna vertoont een voorbeeld van gemiddelde pH-afwijkingen tijdens de enzymatische ontgommingswerkwijze die is uitgevoerd zoals in voorbeeld 10 beschreven is.

[0412] De experimenten worden uitgevoerd met Lecitase™. Zie voorbeeld 11 voor verdere bijzonderheden.

15

Tabel 13

| pH waarden van t = 35 min. – 6 uur | | | | |
|------------------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Tijd (uren) | pH Vb. #8 (2,0 q.) | pH Vb. #15 (2,0 q.) | pH Vb. #19 (1,0 q.) | pH Vb. #20 (3,0 q.) |
| 0,58 | 4,97 | 5,80 | 4,45 | 7,38 |
| 1,0 | 5,82 | 5,75 | 4,46 | 7,63 |
| 2,0 | 5,50 | 5,44 | 4,57 | 8,13 |
| 3,5 | 5,35 | 5,34 | - | 8,37 |
| 5,0 | 5,35 | 5,47 | 4,47 | 8,21 |
| 6,0 | 5,01 | 5,26 | 4,43 | 8,05 |

- [0413] Indien geen andere waarden in de voorbeelden van de hierin beschreven ontgommingsexperimenten worden vermeld, zijn de standaard-pH-afwijkingen in deze experimenten zoals in tabel 13 hierboven is vermeld.

Voorbeeld 14

Vergelijking van het vermogen tot enzymatische ontgommings

- 10 van Lecitase™ en een fosfolipase van *Fusarium oxysporum* volgens de uitvinding

[0414] In Fig. 2 worden de resultaten van de PL's onder hun eigen respectieve optimale omstandigheden getoond, zoals in de voorbeelden 11 en 12 hierboven is bepaald.

[0415] Experimentomstandigheden, getoond in Fig. 2:

15

Lecitase™: 60°C, pH 5,5 (2,0 eq. NaOH), en 1 mg enzym/kg olie (ongeveer 535 E)
(vb. # 9)

Fusarium oxysporum PL: 40°C, pH 5,0 (1,5 eq. NaOH) en 0,8 mg enzym/kg olie
(vb. # 33)

20

Fusarium oxysporum PL: 45°C, pH 5,0 (1,5 eq. NaOH) en 1,6 mg enzym/kg olie
(vb. # 64)

[0416] Klaarblijkelijk geeft de PL van *Fusarium oxysporum* een zeer snel ontgommings-effect in vergelijking met Lecitase™.

[0417] De PL van *Fusarium* geeft na ongeveer 25 minuten contact van het enzym met de olie een bijna volledige ontgomming.

Voorbeeld 15

5

Bepaling van de hoeveelheid niet-hydrateerbare fosfolipiden die in verschillende typen eetbare oliën aanwezig is

Oliën:

10

[0418] Onzuivere raapzaadolie van van Århus Oliefabrik (AOM), Denemarken.
Lading C00745/B01146, P-gehalte 609 ppm. Deze lading bevat vaste resten.

[0419] Onzuivere raapzaadolie van Scanola (Denemarken)
Lading C00745/B01593, P-gehalte 315 ppm.

15

[0420] Gefiltreerde onzuivere raapzaadolie
Lading C00745/B01146, P-gehalte 231 ppm.
Deze olie is Lading C00745/B01146 boven (609 ppm), gefiltreerd door een 100-µm-Johnson-filter.

[0421] Onzuivere raapzaadolie van van Århus Oliefabrik (AOM), Denemarken.
Lading C00745/B01700, P-gehalte 459 ppm.

20

[0422] Raapzaadolie van Lurgi, Duitsland
Lading C00932/B01381, P-gehalte 148 ppm.

[0423] Ruwe sojaolie van Århus Oliefabrik, Denemarken.
Lading C00744/B01145, P-gehalte 593 ppm.

25

[0424] Bepaling van de hoeveelheid niet-hydrateerbare fosfolipiden die in de verschillende typen hierboven vermelde eetbare oliën aanwezig is, werd uitgevoerd door voorbehandeling van de oliën met een oplossing die citroenzuurmonohydraat in water omvat, zoals in voorbeeld 10 hierboven is beschreven.

[0425] Kort samengevat omvat de voorbehandelingswerkwijze

30

(i) voorbehandeling van de eetbare olie bij 60°C door het toevoegen van een oplossing die citroenzuurmonohydraat in water omvat (toegevoegd water ten

- opzichte van olie = 4,8% gew./gew.; [citroenzuur] in waterfase = 106 mM, in water/olie-emulsie = 4,6 mM) gedurende 30 minuten;
- (ii) overbrengen van 10 ml van de voorbehandelde water-in-olie-emulsie naar een buisje;
- 5 (iii) het 30 minuten verwarmen van de emulsie in een kokend waterbad.
- (iv) 10 minuten centrifugeren bij 5000 rpm.
- (v) het overbrengen van ongeveer 8 ml van de bovenste (olie) fase naar een nieuw buisje en 24 uur het laten bezinken ervan;
- 10 onttrek na het bezinken 2 g van de bovenste heldere fase voor het meten van het gehalte niet-hydrateerbare fosfor (ppm) in de eetbare olie. De ppm-waarde werd bepaald zoals in voorbeeld 10 hierboven is beschreven.
- [0426] Na deze werkwijze was de hoeveelheid niet-hydrateerbare fosfolipiden die zich in de verschillende typen hierboven vermelde eetbare oliën als volgt:
- 15 De onzuivere raapzaadolie #1146 van AOM bevat vaste deeltjesvormige stof die gedeeltelijk verantwoordelijk is voor het hoge P-niveau (609 ppm); filtreren door een 100 µm Johnson-zeef gaf een heldere olie met een P-gehalte van 231 ppm.
- [0427] Voorbehandeling van de onzuivere olie en de gefiltreerde olie gaf een P-niveau van 140 ppm, hetgeen een maatstaf van de in de olie aanwezige niet-
- 20 hydrateerbare fosfolipiden is;
- het fosfolipidegehalte van een onzuivere raapzaadolie van Scanola werd verminderd van 315 ppm tot ongeveer 30 ppm door middel van de voorbehandeling;
- het fosfolipidegehalte van een raapzaadolie die werd verkregen van Lurgi
- 25 (waarschijnlijk een arbitrair mengsel van onzuivere olie en volledig geraffineerde olie) werd door de voorbehandelingswerkwijze tot 60 ppm verminderd;
- voorbehandeling van onzuivere raapzaadolie #1710 van AOM verminderde het P-gehalte van 459 tot 200-250 ppm;
- voorbehandeling met onzuivere sojaolie #1145 van AOM verminderde het P-gehalte
- 30 van 593 tot 10 ppm. Deze sojaolie vormt een voorbeeld van oliën die kunnen worden ontgomd met alleen met water ontgommen/behandeling met citraat.
- Enzymtoevoeging aan deze onzuivere sojaolie na voorbehandeling verminderde het P-gehalte niet verder.

[0428] Deze gegevens laten zien dat de fosfolipidesamenstelling (hydrateerbaar ten opzichte van niet-hydrateerbaar fosfolipide) van onzuivere raapzaadolie sterk varieert van de ene lading ten opzichte van de andere lading en dientengevolge zal het niveau
 5 van resterende fosfolipiden in met water ontgomde raapzaadolie over een breed gebied (30 ppm (Scanola) tot 200-250 ppm (AOM)) variëren.

[0429] Voor enzymatische ontgoming is de optimale enzymdosering afhankelijk van de hoeveelheid niet-hydrateerbare fosfolipiden na ontgoming of voorbehandeling.

10 [0430] Verder geldt dat hoe hoger de in de olie aanwezige hoeveelheid niet-hydrateerbare fosfolipide is, des te geschikter de werkwijze van enzymatische ontgoming is.

[0431] Dit wordt eveneens in voorbeeld 16 hierna geïllustreerd, waarin de onderhavige uitvinding enzymatische ontgoming van de onzuivere raapzaadolie
 15 #1146 vertoont, die een fosfolipideniveau van ongeveer 140 ppm bezit.

Voorbeeld 16

Ontgoming van onzuivere eetbare raapzaadolie (I)

20

[0432] Experimenten A en B werden uitgevoerd volgens de "algemene werkwijzen voor het uitvoeren van enzymatische ontgoming" zoals in voorbeeld 10 hierboven is beschreven.

25 Olie:

[0433] Onzuivere raapzaadolie van Århus Oliefabrik (AOM), Denemarken. Lading C00745/B01146, P-gehalte 609 ppm. Deze lading bevat vaste resten.

30 Enzym:

[0434] Lecitase™ 10L

Lading L646-F02 (10190 E/ml), geschatte conc. 20 mg/ml

[0435] PL van *Fusarium oxysporum* die de aminozuursequentie heeft die is getoond in SEQ Nr. 2.

Lading F-9700123, OD₂₈₀ 1,48, zuiverheid ongeveer 58%, geschatte conc. 0,9 mg/ml.

Het enzym werd op recombinante wijze tot expressie gebracht en gezuiverd zoals

5 hierboven is beschreven.

Experiment A (referentie)

[0436] 0,6 l (580 g) onzuivere raapzaadolie wordt in de uitrusting geladen en tot
10 60°C verwarmd. Bij t = 30 min. wordt 1,43 ml (5,7 mmol) van 4 M NaOH-oplossing toegevoegd, hetgeen een pH van ongeveer 5,6 geeft. Bij t = 35 min. wordt 30 µl (300 eenheden) Lecitase 10L (verkregen van Novo Nordisk A/S) toegevoegd. Het gemeten fosforgehalte in de oliefase na centrifugeren, alsook de pH-waarden in de waterfase wordt in tabel 14 getoond.

15

Tabel 14

| Resultaten voor ontgoming van onzuivere raapzaadolie met Lecitase™ | | |
|--|---------------------------|-----|
| Tijd (uren) | Fosforgehalte in oliefase | pH |
| 0 | 609 | |
| 0,50 | 155 | 4,8 |
| 0,58 | 146 | 5,6 |
| 1,0 | 127 | 5,6 |
| 2,0 | 88 | 5,7 |
| 3,5 | 61 | 5,7 |
| 5,0 | 44 | 5,6 |
| 6,0 | 34 | 5,8 |

Experiment B

20 [0437] 0,6 l (581 g) onzuivere raapzaadolie wordt in de uitrusting gebracht en tot 40°C verwarmd. Bij t = 30 min. wordt 1,07 ml (4,3 mmol) van 4 M NaOH-oplossing toegevoegd, hetgeen een pH van ongeveer 5,4 geeft. Bij t = 35 min. wordt 1 ml (0,9

mg) van een gezuiverde oplossing (voorbeeld 2) van fosfolipase van *F. oxysporum* toegevoegd. Het gemeten fosforgehalte in de oliefase na centrifugeren, alsook de pH-waarden in de waterfase wordt in tabel 15 getoond.

5

Tabel 15

| Resultaten van ontgomming van onzuivere raapzaadolie met fosfolipase van <i>F. oxysporum</i> | | |
|--|---------------------------|-----|
| Tijd (uren) | Fosforgehalte in oliefase | pH |
| 0 | 609 | |
| 0,50 | 155 | 4,9 |
| 0,58 | 149 | 5,4 |
| 1,0 | 91 | 5,3 |
| 2,0 | 13 | 5,4 |
| 3,5 | 11 | 5,3 |
| 5,0 | 13 | 5,4 |
| 6,0 | 10 | 5,2 |

Voorbeeld 17

Ontgomming van onzuivere eetbare raapzaadolie (II)

10

[0438] Experimenten A en B werden uitgevoerd overeenkomstig de "Algemene werkwijze voor het uitvoeren van enzymatische ontgomming", zoals in voorbeeld 10 hierboven is beschreven.

15 Olie:

[0439] Onzuivere raapzaadolie van van Århus Oliefabrik (AOM), Denemarken. Lading C00745/B01710, P-gehalte 459 ppm.

20 Enzym:

Lecitase™ 10L

EU 0 869 167 B1

[0440] Lading 646-F02 (10190 E/ml), geschatte conc. 20 mg/ml.

[0441] PL van *Fusarium oxysporum* met de in SEQ Nr. 2 getoonde aminozuursequentie.

- 5 Lading F-9700476, OD₂₈₀ 0,8, zuiverheid ongeveer 58%, geschatte conc. 0,45 mg/ml.
Het enzym werd op recombinante wijze tot expressie gebracht en gezuiverd zoals hierboven is beschreven.

Experiment A

10

[0442] 0,6 l (580 g) onzuivere raapzaadolie wordt in de uitrusting gebracht en bij 60°C verwarmd. Bij t = 30 min. wordt 1,43 ml (5,7 mmol) van 4 M NaOH-oplossing toegevoegd, hetgeen een pH van ongeveer 5,6 geeft. Bij t = 35 min. wordt een geschikte hoeveelheid (b.v. 50 µl (ongeveer 500 eenheden) voor 1 mg enzym/kg olie)

- 15 Lecitase 10L (verkregen van Novo Nordisk A/S) toegevoegd. Het gemeten fosforgehalte in de oliefase na centrifugatie wordt in tabel 16 getoond.

Tabel 16

| Resultaten van ontgomming van onzuivere raapzaadolie met Lecitase. | | | |
|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Tijd (uren) | 1 mg Lecitase/kg olie P(ppm) | 2 mg Lecitase/kg olie P(ppm) | 3 mg Lecitase/kg olie P(ppm) |
| 0 | 459 | 459 | 459 |
| 0,50 | 251 | 235 | 248 |
| 0,58 | 202 | 194 | 202 |
| 1,0 | 181 | 186 | 183 |
| 2,0 | 165 | 156 | 107 |
| 3,5 | 111 | 66 | 11 |
| 5,0 | 52 | 12 | 12 |
| 6,0 | 20 | 5 | 9 |

20 Experiment B

- [0443] 0,6 l (581 g) onzuivere raapzaadolie wordt in de uitrusting gebracht en tot 40°C verwarmd. Bij t = 30 min. wordt 1,07 ml (4,3 mmol) van 4 M NaOH-oplossing toegevoegd, hetgeen een pH van ongeveer 5,0 geeft. Bij t = 35 min. wordt een geschikte hoeveelheid (b.v. 1,6 mg enzym/kg olie en 3,2 mg enzym/kg olie) van een gezuiverde oplossing van fosfolipase van *F. oxysporum* toegevoegd. Het gemeten fosforgehalte in de oliefase na centrifugeren wordt in tabel 17 getoond.

Tabel 17

| Resultaten van ontgoming van onzuivere raapzaadolie met fosfolipase van <i>F.oxysporum</i> | | |
|--|---|---|
| Tijd (uren) | 1,6 mg <i>Fusarium</i> / kg olie P(ppm) | 3,2 mg <i>Fusarium</i> / kg olie P(ppm) |
| 0 | 459 | 459 |
| 0,50 | 236 | 208 |
| 0,58 | 193 | 173 |
| 1,0 | 109 | 96 |
| 2,0 | 9 | 7 |
| 3,5 | 9 | 8 |
| 5,0 | 9 | 9 |
| 6,0 | 9 | 9 |

- 10 Samengevat vertonen de resultaten,

Lecitase, 60°C, pH 5,5

De enzymdosering werd gevarieerd van 1,0 tot 3,0 mg/kg olie. De resultaten worden in tabel 16 hierboven vermeld. Bij een enzymdosering van 1,0 mg/kg olie was de ontgoming langzaam en gaf ongeveer 20 ppm na 6 uur. Met de hoge

- 15 enzymdoseringen werd de ontgommingsprestatie verbeterd onder verkrijging van een fosforgehalte van 10 ppm na ongeveer 3,5 uur met 3,0 mg enzym/kg olie.

[0444] Verondersteld wordt dat de prestatie verder zal worden verbeterd indien hogere enzymdoseringen worden toegepast.

- 20 *F.oxysporum* PL. 45°C, pH 5.0

- [0445] De enzymdoseringen van 1,6 en 3,2 mg/kg olie werden getest en de prestatie bleek even goed te zijn (tabel 17 hierboven). Met 1,6 mg enzym/kg olie – of mogelijk later – werd uitstekende ontgomming waargenomen die 9 ppm P na ongeveer 2 uur gaf. Het wordt voorzien dat het mogelijk is zelfs geringere hoeveelheden van het
- 5 *F.-oxysporum*-fosfolipase te gebruiken (b.v. 0,9 mg/kg olie) met nog steeds een goede ontgommingsprestatie.

Voorbeeld 18

- 10 Ontgomming van in water ontgomde eetbare olie onder toepassing van een fosfolipasepreparaat dat verkregen is van *Fusarium culmorum*

- [0446] Een experiment werd uitgevoerd volgens de "Algemene werkwijzen voor het uitvoeren van enzymatische ontgomming" zoals in voorbeeld 10 hierboven is
- 15 beschreven.

Olie

- [0447] Met water ontgomde raapzaadolie van Århus Oliefabrik (AOM),
- 20 Denemarken.
- Lading C00730/B01700, P-gehalte 231 ppm.

Enzym:

- 25 [0448] Een fermentatiesuspensie van *Fusarium colmorum*. Een *Fusarium-colmorum*-stam werd gekweekt, gecentrifugeerd, en het supernatant werd gezuiverd zoals hierboven is beschreven.
- [0449] Entkweken van de stam *Fusarium culmorum* CBS 513.94 (deponeringsdatum 25 oktober 1994) werden geproduceerd in 500 ml schudkolven die
- 30 100 ml van de volgende samenstelling bevatten:

| | |
|-----------------------|--------|
| Maïssiroop (gedroogd) | 12 g/l |
| Glucose | 24 g/l |

Aan elke kolf wordt 0,5 g CaCO_3 en 0,5 ml olie toegevoegd.

[0450] De pH wordt ingesteld op 5,5 voor verhitting in een autoclaaf.

[0451] Na 3 dagen bij 26°C en 250 rpm werd 5 ml van elk van de entkweken

5 geïnoculeerd in schudkolven die 100 ml van het volgende medium bevatten:

| | |
|-------------------------------|---------|
| Pepton, Difco 0118 | 6 g/l |
| Peptidase, Sheffield Products | 4 g/l |
| Gistextract, Difco 0127 | 3 g/l |
| Vleesextract, Difco 0126 | 1,5 g/l |
| Dextrose, Roquette 101-0441 | 1 g/l |
| Olijfolie, Sigma | 10 g/l |

De pH wordt voor verhitting in de autoclaaf ingesteld op 7,3-7,4.

[0452] Het kweken vond 9 dagen bij 26°C en 250 rpm plaats. De suspensies

10 werden gecentrifugeerd en gefiltreerd (0,45 μm), de supernatanten werden verzameld en voor het hierna vermelde ontgommingsexperiment aangewend.

[0453] Vastgestelde activiteit 200 PHLU/ml.

Experiment:

15

Enzymatische ontgoming van een met water ontgomde olie onder gebruikmaking van een fosfolipasepreparaat, verkregen van *Fusarium culmorum*

[0454] 0,6 l (581 g) onzuivere raapzaadolie wordt in de uitrusting gebracht en tot

20 40°C verwarmd. Bij $t = 30$ min. wordt 1,43 ml (5,7 mmol) van 4 M NaOH-oplossing toegevoegd, hetgeen een pH van ongeveer 5,5 geeft. Bij $t = 35$ min. wordt een geschikte hoeveelheid (b.v. 1070 PHLU/kg olie) van een gezuiverde oplossing van fosfolipase van *F. oxysporum* toegevoegd. Het gemeten fosforgehalte in de oliefase na centrifugeren wordt in tabel 18 getoond.

25

Tabel 18

| Resultaten van ontgomming van onzuivere raapzaadolie met fosfolipase van <i>F. culmorum</i> . | |
|---|---|
| Tijd (uren) | 1070 E <i>F.culmorum</i> / kg olie P(ppm) |
| 0 | 254 |
| 0,50 | - |
| 0,58 | 213 |
| 1,0 | 137 |
| 2,0 | 61 |
| 3,5 | 9 |
| 5,0 | 8 |
| 6,0 | 7 |

Voorbeeld 19

5

Enzymatische ontgomming van onzuivere olie onder gebruikmaking van Degomma VODOlie:

10

[0455] Onzuivere raapzaadolie C00745/B01700, P-gehalte 459 ppm

Enzym:

- 15 [0456] Een in de handel verkrijgbare fosfolipase Degomma VOD (Röhm; Duitsland), geschatte conc. 10 mg/ml.
- 0,6 l (581 g) onzuivere raapzaadolie wordt in de uitrusting gebracht en tot 50°C verwarmd. Bij t = 30 min. wordt 0,714 ml (2,86 mmol) van 4 M NaOH-oplossing toegevoegd, hetgeen een pH van ongeveer 4,5 geeft. Bij t = 35 min. wordt een
- 20 geschikte hoeveelheid (b.v. 3,6mg/kg olie of 7,1 mg/kg olie) van een gezuiverde oplossing van fosfolipase van Degomma VOD toegevoegd. Het gemeten fosforgehalte in de oliefase na centrifugeren wordt in tabel 19 getoond.

Tabel 19

| Tijd | 3,6 mg/kg olie | 7,1 mg/kg olie |
|------|----------------|----------------|
| 0 | 276 | 273 |
| 0,50 | 216 | 253 |
| 0,58 | 210 | 246 |
| 1,0 | 127 | 94 |
| 2,0 | 45 | 16 |
| 3,5 | 15 | 7 |
| 5,0 | 15 | 10 |
| 6,0 | 14 | 10 |

- [0457] Dit voorbeeld illustreert dat Degomma VOD in staat is een eetbare olie te ontgommen. Echter, teneinde een bevredigende ontgomming van de olie te verkrijgen zijn relatief hoge doseringen van Degomma VOD vereist in vergelijking met het *Fusarium*-fosfolipase volgens de uitvinding. Zie b.v. voorbeelden 16 en 17 voor een vergelijking.

10 Voorbeeld 20

Gebruik van een fosfolipase, verkregen van *F. oxysporum* als een broodverbeterend middel

15 Materialen en werkwijzen

Bereiding van brood

- [0458] Europees zuiver deeg, witbrood en broodjes, werden volgens het volgende basisrecept bereid:

| BASISRECEPT | |
|-------------------|--------------|
| Meel (Meneba BBZ) | 100% (2000g) |
| Water | 61% |
| Gist | 4% |
| Zout | 1,5% |
| Suiker | 1,5% |
| Ascorbinezuur | 40 ppm |

| BAKWERKWIJZE | | |
|---|-----------------------|---------|
| Mengen (spiraalmenginrichting), 625 RPM | | 3 min |
| Mengen (spiraalmenginrichting), 1250 RPM | | 3,5 min |
| Beoordeling van deeg | | 7 min |
| Rijzen (kamertemperatuur) | | 15 min |
| platmaken/ kneden | | 3 min |
| Relaxatie op kamertemperatuur | | 5 min |
| Opvouwing | | 2 min |
| Relaxatie op kamertemperatuur | | 5 min |
| platmaken/ kneden / in een pan brengen | | 2 min |
| opnieuw laten rijzen van de broodjes (32°C, 82% RH) | | 45 min |
| | Brood in pan gebakken | 55 min |
| Bakken (230°C) | Broodjes | 22 min |
| | Brood in pan gebakken | 55 min |

Beoordeling van deeg en gebakken producten

- 5 [0459] De eigenschappen van het deeg en de gebakken producten werden als volgt bepaald:
- [0460] Index van specifiek volume: Het volume van een brood of broodje wordt gemeten door middel van de traditionele werkwijze van verdringing van raapolie. Het specifieke volume wordt berekend als volume ml per g brood. Het specifieke volume van de controle (zonder enzym) is gedefinieerd als 100. Het relatieve specifieke volume wordt berekend als

$$\text{Index van specifiek volume} = \frac{\text{specifiek volume}}{\text{specifiek volume van controlebrood}} * 100$$

- [0461] De kleverigheid van het deeg wordt handmatig volgens de volgende schaal
5 beoordeeld:

| | | |
|---------------------------|-----------|---|
| Uiterlijk van het broodje | erg plat | 1 |
| | plat | 2 |
| | normaal | 3 |
| | goed/rond | 4 |
| | erg goed | 5 |
| | te rond | 6 |

Resultaten

- 10 [0462]

Tabel 20

| Enzym/toevoegsel | | | | | | | | |
|---|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|
| Lecimulthine 100* (g/kg/meel) | | | | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| F.o. Fosfolipase (LU/kg meel) | | 500 | 1500 | 3000 | | 500 | 1500 | 3000 |
| Specifiek volume-index (broodjes) | 100 | 110 | 106 | 93 | 99 | 111 | 116 | 108 |
| Specifiek volume-index (brood in pan gebakken) | 100 | 106 | 99 | 94 | 102 | 107 | 109 | 103 |
| Broodjesuiterlijk (score) | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 5 | 4,5 |

*commercieel lecithinepreparaat voor bakken (Superfos, Denemarken).

- 15 [0463] De resultaten vertonen een duidelijk effect van volumetoename van het
Fusarium-oxysporum-fosfolipase op zowel broodjes als in een pan gebakken brood met

het recept dat geen lecithine bevat. Indien lecithine in het recept is opgenomen, worden zelfs betere volume-effecten verkregen, hoewel de lecithine niet aan het volume zelf bijdraagt. Een statistische analyse (ANOVA, $\alpha=0,05$), uitgevoerd in Statgraphics Plus, release 3,0, vertoont een aanzienlijk positieve synergie tussen het fosfolipase en de lecithine.

[0464] Zowel met als zonder lecithine in het recept wordt een aanzienlijk verbeterde vorm van de broodjes (uiterlijk van het broodje) wordt verkregen met het *F.-oxysporum*-fosfolipase. In dit voorbeeld werd het beste uiterlijk van het broodje verkregen door het combineren van lecithine en fosfolipase (1500 LU/kg meel).

- 10 [0465] Europees zuiver deeg, wittebrood en broodjes, werden volgens het volgende basisrecept bereid:

| BASISRECEPT | |
|--------------------|--------------|
| Bloem (Meneba BBZ) | 100% (2000g) |
| Water | 61% |
| Gist | 5% |
| Zout | 1,5% |
| Suiker | 1,5% |
| Ascorbinezuur | 40 ppm |

| BAKPROCEDURE | |
|---|---------|
| Mixen (spiraalmenginrichting), 625 RPM | 3 min |
| Mixen (spiraalmenginrichting), 1250 RPM | 3,5 min |
| Deegbeoordeling | 7 min |
| Rijzen(kamertemperatuur) | 15 min |
| Plat maken/ kneden | 3 min |
| Relaxatie bij kamertemperatuur | 5 min |
| Opvouwen | 2 min |
| Relaxatie bij kamertemperatuur | 5 min |
| Platmaken / kneden / in pan brengen | 2 min |
| Opnieuw laten rijzen (32°C, 85% RH) | 55 min |
| Bakken (230°C) | 35 min |

In dit voorbeeld werden de broden in van een deksel voorziene pannen gebakken, teneinde verschillen in de specifieke volumes voor textuuranalyse te voorkomen. Na afkoeling werden de broden bij kamertemperatuur bewaard, verpakt in kunststof zakken.

Beoordeling van gebakken producten

[0466] Beoordeling van de bederfelijkheid en de textuur kan worden uitgevoerd volgens AACC-methode 74-09. Beoordeling van de zachtheid van broodkruimels als indicatoren van broodbederf werden 0, 1, 3 en 7 dagen na het bakken uitgevoerd volgens de volgende werkwijze:

[0467] Een snee brood werd samengedrukt bij een constante snelheid in een textuuranalyse-inrichting (TA TX-2) en de kracht voor het samendrukken werd in g gemeten. De stevigheid van de kruimel wordt gemeten als de kracht bij 25% samendrukken. De stevigheid van een broodkruimel neemt toe als het brood oud wordt.

RESULTATEN

[0468] De resultaten van hardheidsmetingen als een functie van bewaardagen wordt in tabel 2 getoond. Lecimulthine werd toegevoegd in een concentratie van 1 g/kg meel, en het *Fusarium-oxysporum*-fosfolipase werd toegevoegd in een dosering van 500 E/kg meel. Elke figuur in de tabel is de gemiddelde waarde van 6 metingen (2 broden, op elk 3 metingen).

Tabel 21

| Enzym/toevoegsel | Stevigheid | Stevigheid Dag | Stevigheid | Stevigheid |
|------------------|------------|----------------|------------|------------|
|------------------|------------|----------------|------------|------------|

| | Dag 0 | 1 | Dag 3 | Dag 7 |
|------------------------------------|-------|-----|-------|-------|
| Controle | 223 | 350 | 631 | 1061 |
| Lecimulthine 100* | 25 | 261 | 532 | 1010 |
| Fosfolipase | 201 | 303 | 573 | 1257 |
| Lecimulthine 100* + Fosfolipase | 169 | 304 | 468 | 834 |

*In de handel verkrijgbare lecithine preparatie voor bakken (Superfos, Denemarken)

- [0469] Zoals in tabel 21 is getoond waren de met fosfolipase behandelde broden tot 3 dagen bewaren enigszins zachter dan het controlebrood. In combinatie met
- 5 lecithine kon een aanzienlijk anti-verouderingseffect tijdens de gehele bewaarperiode worden verkregen (niet verkrijgbaar met alleen lecithine of fosfolipase).

SEQUENTIE-OVERZICHT

- 10 [0470] SEQ ID Nr. 1 toont een gekloonde DNA-sequentie volgens de uitvinding, omvattende een DNA-sequentie die codeert voor een enzym dat fosfolipase-activiteit vertoont.

(2) INFORMATIE VOOR SEQ ID NR. 1:

15

[0471]

(i) SEQUENTIEKENMERKEN:

- 20 (A) LENGTE: 1170 basenparen
 (B) TYPE: nucleïnezuur
 (C) STRENGTHTYPE: enkelstrengs
 (D) TOPOLOGIE: lineair

- 25 (ii) MOLECUULTYPE: cDNA

(vi) OORSPRONKELIJKE BRON:

(A) ORGANISME: *Fusarium oxysporum*

(B) STAM: DSM 2672

5 (ix) EIGENSCHAP:

(A) NAAM/SLEUTEL: CDS

(B) LOKATIE: 23..1063

10 (xi) SEQUENTIEBESCHRIJVING: SEQ ID NR. 1:

| | | | |
|----|---|--|-----|
| | TTGGAGAATA TTCCTTGTC | CG ATG CTT CTT CTA CCA CTC CTC TCG GCC ATC | 52 |
| | | Met Leu Leu Leu Pro Leu Leu Ser Ala Ile | |
| 15 | | 1 5 10 | |
| | ACC CTC GCC GTA GCC AGT OCT GTA GCT CTC GAC GAC TAC GTC AAC TCT | | 100 |
| | Thr Leu Ala Val Ala Ser Pro Val Ala Leu Asp Asp Tyr Val Asn Ser | | |
| | 15 20 25 | | |
| | CTT GAG GAG CGA GCT GTT GGT GTC ACT ACA ACC GAC TTC AGC AAC TTC | | 148 |
| | Leu Glu Glu Arg Ala Val Gly Val Thr Thr Thr Asp Phe Ser Asn Phe | | |
| 20 | 30 35 40 | | |
| | AAG TTC TAC ATC CAA CAC GGC GCC GCA GCT TAC TGC AAC TCT GAA GCC | | 196 |
| | Lys Phe Tyr Ile Gln His Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Ala | | |

25

30

| | | | | |
|----|--|-----|-----|-----|
| | 45 | 50 | 55 | |
| 5 | CCA GCT GGT TCC AAG ATC ACC TGC TCC AAC AAT GGC TGT CCA ACC GTT Ala Ala Gly Ser Lys Ile Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Thr Val | 244 | | |
| | 60 | 65 | 70 | |
| | CAG GGC AAC GGA GCG ACC ATC GTG ACA TCT TTC GTT GGC TCC AAG ACA Gln Gly Asn Gly Ala Thr Ile Val Thr Ser Phe Val Gly Ser Lys Thr | 292 | | |
| | 75 | 80 | 85 | 90 |
| 10 | GGT ATC GGT GGC TAC GTC GCG ACA GAC TCT GCC CGA AAG GAA ATC GTC Gly Ile Gly Gly Tyr Val Ala Thr Asp Ser Ala Arg Lys Glu Ile Val | 340 | | |
| | 95 | 100 | 105 | |
| | GTC TCG TTC CGC GGA AGC ATC AAT ATT CGA AAC TGG CTT ACC AAC CTC Val Ser Phe Arg Gly Ser Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu | 388 | | |
| | 110 | 115 | 120 | |
| 15 | GAC TTC GGC CAG GAA GAC TGC AGT CTC GTC TCT GGA TGC GGT GTG CAC Asp Phe Gly Gln Glu Asp Cys Ser Leu Val Ser Gly Cys Gly Val His | 436 | | |
| | 125 | 130 | 135 | |
| | TCT GGC TTC CAG CGA GCC TGG AAT GAA ATC TCG TCT CAA GCA ACC GCT Ser Gly Phe Gln Arg Ala Trp Asn Glu Ile Ser Ser Gln Ala Thr Ala | 484 | | |
| | 140 | 145 | 150 | |
| 20 | GCT GTT GCC TCC GCC CGC AAG GCG AAC CCT TCT TTC AAC GTC ATT TCT Ala Val Ala Ser Ala Arg Lys Ala Asn Pro Ser Phe Asn Val Ile Ser | 532 | | |
| | 155 | 160 | 165 | 170 |
| | ACA GGC CAC TCC CTT GGA CGT GCC GTG GCC GTT CTT GCT GCC GCA AAC Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Val Ala Val Leu Ala Ala Ala Asn | 580 | | |
| | 175 | 180 | 185 | |
| 25 | TTG AGA GTC GGT GGA ACA CCC GTC GAT ATT TAC ACC TAC GGC TCT CCC Leu Arg Val Gly Gly Thr Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro | 628 | | |
| | 190 | 195 | 200 | |
| | CGT GTC GGA AAC GCG CAG CTC TCA GCC TTC GTC TCA AAC CAG GCT GGT Arg Val Gly Asn Ala Gln Leu Ser Ala Phe Val Ser Asn Gln Ala Gly | 676 | | |
| | 205 | 210 | 215 | |
| 30 | GGA CAG TAC CGC GTT ACA CAC GCT GAT GAC CCT GTC CCC CGT CTC CCT Gly Glu Tyr Arg Val Thr His Ala Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro | 724 | | |
| | 220 | 225 | 230 | |

| | | |
|----|---|------|
| | CCT CTG ATC TTC GGA TAC AGG CAC ACA ACT CCT GAG TTC TCG CTG TCC | 772 |
| | Pro Leu Ile Phe Gly Tyr Arg His Thr Thr Pro Glu Phe Trp Leu Ser | |
| | 235 240 245 250 | |
| 5 | GGC GGT GGA GGC GAC AAG GTT GAC TAC ACC ATC AGC GAT GTC AAG GTC | 820 |
| | Gly Gly Gly Gly Asp Lys Val Asp Tyr Thr Ile Ser Asp Val Lys Val | |
| | 255 260 265 | |
| | TGT GAG GGT GCT GCC AAC CTT GGA TGC AAC GGT GGA ACT CTT GGT TTG | 868 |
| | Cys Glu Gly Ala Ala Asn Leu Gly Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu | |
| | 270 275 280 | |
| 10 | GAT ATT GCT GCT CAT CTG CAT TAC TTC CAG GCG ACT GAC GCC TGT AAC | 916 |
| | Asp Ile Ala Ala His Leu His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn | |
| | 285 290 295 | |
| | GCT GGT GGC TTC TCT TCG CGA CGA TAC ACA AGC GCC GAG AGC GTC GAC | 964 |
| | Ala Gly Gly Phe Ser Trp Arg Arg Tyr Arg Ser Ala Glu Ser Val Asp | |
| | 300 305 310 | |
| 15 | AAG AGG GCC ACC ATG ACT GAT GCC GAG CTT GAG AAG AAG CTG AAC TCT | 1012 |
| | Lys Arg Ala Thr Met Thr Asp Ala Glu Leu Glu Lys Lys Leu Asn Ser | |
| | 315 320 325 330 | |
| | TAT GTC CAG ATG GAT AAG GAG TAT GTG AAG AAT AAC CAG GCC CGC TCT | 1060 |
| | Tyr Val Gln Met Asp Lys Glu Tyr Val Lys Asn Asn Gln Ala Arg Ser | |
| | 335 340 345 | |
| 20 | TAA CGAGGGTATG AGGTTTCATG CGAAATGACA TGATTATGA ACCAAACCAT | 1113 |
| | * | |
| | AGTACATATG ATGCCAATAG GATATAAAAA CATATTTCAT TCACTAGCTT TACACAA | 1170 |

25

30

SEQ ID NR. 2 toont de aminozuursequentie van een fosfolipase volgens de uitvinding.

(2) INFORMATIE VOOR SEQ ID NR. 2:

5

[0472]

(i) SEQUENTIEKENMERKEN:

10

(A) LENGTE: 346 aminozuren

(B) TYPE: aminozuur

(D) TOPOLOGIE: lineair

(ii) MOLECUULTYPE: eiwit

15

(xi) SEQUENTIEBESCHRIJVING: SEQ ID NR. 2:

Met Leu Leu Leu Pro Leu Leu Ser Ala Ile Thr Leu Ala Val Ala Ser
 1 5 10 15
 5 Pro Val Ala Leu Asp Asp Tyr Val Asn Ser Leu Glu Glu Arg Ala Val
 20 25 30
 Gly Val Thr Thr Thr Asp Phe Ser Asn Phe Lys Phe Tyr Ile Gln His
 35 40 45
 Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Ala Ala Ala Gly Ser Lys Ile
 50 55 60
 10 Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Thr Val Gln Gly Asn Gly Ala Thr
 65 70 75 80
 Ile Val Thr Ser Phe Val Gly Ser Lys Thr Gly Ile Gly Gly Tyr Val
 85 90 95
 Ala Thr Asp Ser Ala Arg Lys Glu Ile Val Val Ser Phe Arg Gly Ser
 100 105 110
 15 Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu Asp Phe Gly Gln Glu Asp
 115 120 125
 Cys Ser Leu Val Ser Gly Cys Gly Val His Ser Gly Phe Gln Arg Ala
 130 135 140
 20 Trp Asn Glu Ile Ser Ser Gln Ala Thr Ala Ala Val Ala Ser Ala Arg
 145 150 155 160
 Lys Ala Asn Pro Ser Phe Asn Val Ile Ser Thr Gly His Ser Leu Gly

25

30

| | | | |
|----|---|-----|-----|
| | 165 | 170 | 175 |
| | Gly Ala Val Ala Val Leu Ala Ala Ala Asn Leu Arg Val Gly Gly Thr | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| 5 | Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro Arg Val Gly Asn Ala Gln | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| | Leu Ser Ala Phe Val Ser Asn Gln Ala Gly Gly Glu Tyr Arg Val Thr | | |
| | 210 | 215 | 220 |
| | His Ala Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Leu Ile Phe Gly Tyr | | |
| 10 | 225 | 230 | 235 |
| | Arg His Thr Thr Pro Glu Phe Trp Leu Ser Gly Gly Gly Gly Asp Lys | | |
| | 245 | 250 | 255 |
| | Val Asp Tyr Thr Ile Ser Asp Val Lys Val Cys Glu Gly Ala Ala Asn | | |
| | 260 | 265 | 270 |
| | Leu Gly Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu Asp Ile Ala Ala His Leu | | |
| 15 | 275 | 280 | 285 |
| | His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn Ala Gly Gly Phe Ser Trp | | |
| | 290 | 295 | 300 |
| | Arg Arg Tyr Arg Ser Ala Glu Ser Val Asp Lys Arg Ala Thr Met Thr | | |
| | 305 | 310 | 315 |
| | Asp Ala Glu Leu Glu Lys Lys Leu Asn Ser Tyr Val Gln Met Asp Lys | | |
| 20 | 325 | 330 | 335 |
| | Glu Tyr Val Lys Asn Asn Gln Ala Arg Ser * | | |
| | 340 | 345 | |

Conclusies

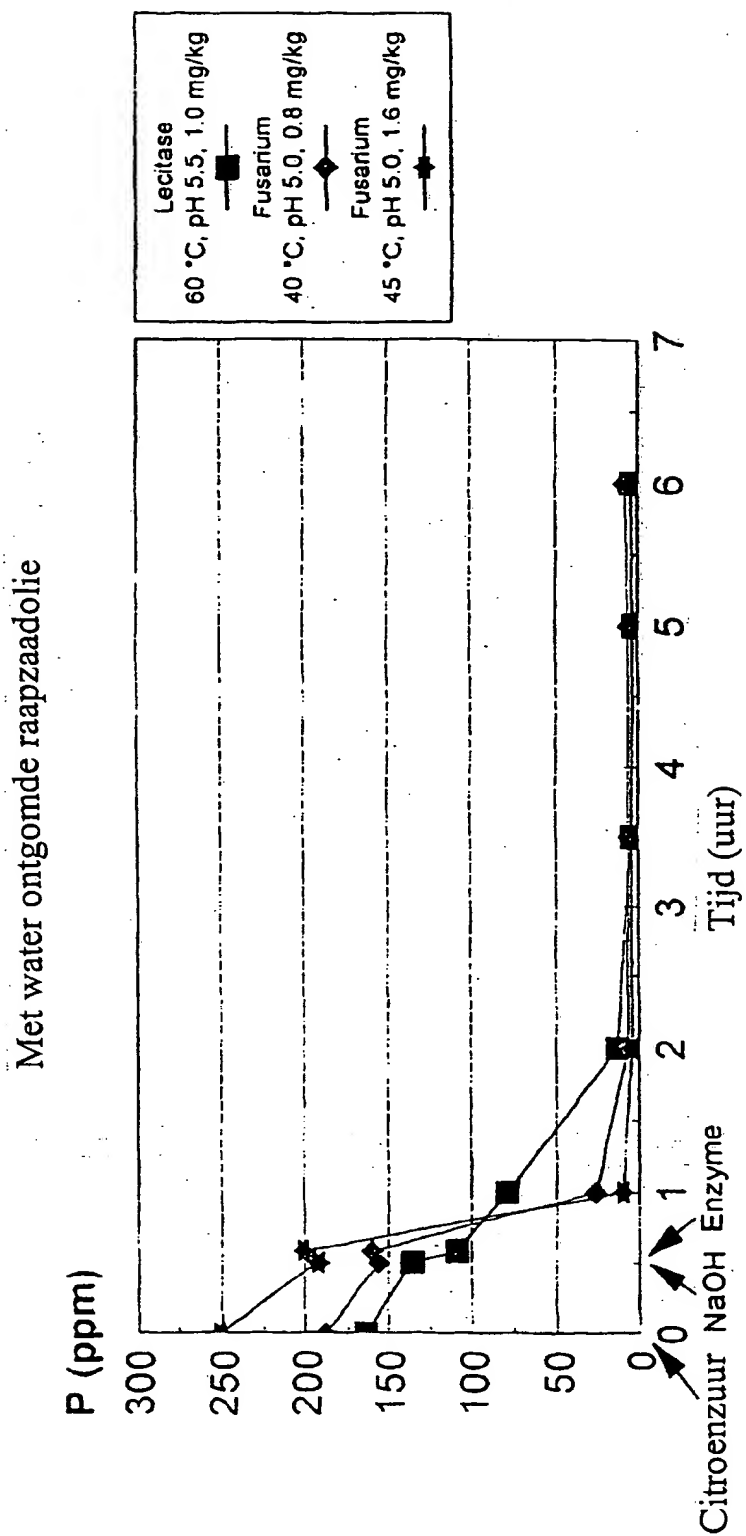
1. Polypeptide dat fosfolipase A-activiteit bezit, gekozen uit de groep bestaande uit:
 - 5 a) een polypeptide dat wordt gecodeerd door het voor fosfolipase A coderende gedeelte van de DNA-sequentie dat is gekloneerd in plasmide pYES 2,0 dat zich in Escherichia coli DSM 11299 bevindt;
 - b) een polypeptide met een aminozuursequentie zoals getoond in posities 31-346 van SEQ ID Nr. 2;
 - 10 c) een polypeptide met een aminozuursequentie zoals getoond in posities 31-303 van SEQ ID Nr. 2; en
 - d) een polypeptide dat ten minste 70% homoloog is met het in (a), (b) of (c) gedefinieerde polypeptide.
2. Polypeptide volgens conclusie 1, dat een fosfolipase A1 is.
- 15 3. Polypeptide, omvattende een sequentie gekozen uit de groep bestaande uit:
 - a) de voor fosfolipase a coderende sequentie die gekloneerd is in plasmide pYES 2,0 die in Escherichia coli DSM 11299 aanwezig is;
 - 20 b) nucleotiden 23-1063 van SEQ ID nr. 1;
 - c) nucleotiden 113-931 van SEQ ID Nr. 1;
 - d) nucleotiden 113-931 van SEQ ID Nr. 1;
 - e) polynucleotide dat voor aminozuren 31-346 van SEQ. ID Nr. 2 codeert;
 - f) polynucleotide dat voor aminozuren 31-303 van SEQ. ID Nr. 2 codeert; en
 - 25 g) polynucleotide dat ten minste 70% homoloog is met elk van de voorgaande polynucleotiden, waarbij de polynucleotiden voor een polypeptide coderen dat fosfolipase A-activiteit vertoont.
4. Polypeptide volgens conclusie 3 die voor een fosfolipase A1-polypeptide codeert.
- 30 5. Vector, omvattende het polypeptide volgens conclusie 3 of 4.
6. Gastheercel, omvattende de vector volgens conclusie 5.

7. Gastheercel volgens conclusie 6, die een eukaryote cel is, in het bijzonder een schimmelcel zoals een draadvormige schimmelcel, b.v. g. *Aspergilles* of *Fusarium*.
- 5 8. Werkwijze voor het produceren van een fosfolipase A, omvattende:
- a) het kweken van de gastheercel volgens conclusie 6 of 7 onder omstandigheden die geschikt zijn voor de expressie van het fosfolipase en
 - b) het winnen van het fosfolipase.
- 10 9. Gebruik van het polypeptide volgens conclusie 1 of 2 in een werkwijze die de behandeling van een fosfolipide of lysofosfolipide met het fosfolipase voor het hydrolyseren van vetacylgroepen omvat.
- 15 10. Gebruik van het polypeptide volgens conclusie 1 of 2 in een werkwijze voor het verminderen van het gehalte fosfolipide in een eetbare olie met een fosforgehalte van 50-250 ppm, omvattende het behandelen van de olie met het polypeptide teneinde een belangrijk gedeelte van het fosfolipide te hydrolyseren en het uit de olie afscheiden van een waterige fase die het gehydrolyseerde fosfolipide bevat.
- 20 11. Gebruik van een polypeptide volgens conclusie 1 of 2 in een werkwijze voor het maken van een gebakken product, omvattende het toevoegen van het polypeptide aan een deeg en het bakken van het deeg om het gebakken product te maken.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| F.oxysporum | 1 | -ML | LL | LL | SA | TL | AV | AS | PV | A-L | D | D | Y | V | N | S | L | E | E | R | A | 31 |
| F.heterosporum | 1 | M | M | L | V | L | S | L | S | I | A | F | T | A | G | P | V | P | S | V | D | 33 |
| F.oxysporum | 32 | V | G | V | T | T | T | D | F | S | N | F | K | F | Y | I | Q | H | G | A | A | 84 |
| F.heterosporum | 34 | V | T | V | T | T | T | D | L | S | N | F | R | F | Y | L | Q | H | A | D | A | 86 |
| F.oxysporum | 65 | T | C | S | N | N | G | C | P | T | V | Q | G | N | G | A | T | I | V | T | S | 97 |
| F.heterosporum | 67 | H | C | S | A | G | N | C | P | D | I | E | K | D | A | I | V | V | G | S | V | 99 |
| F.oxysporum | 98 | T | D | S | A | R | K | E | I | V | V | S | F | R | G | S | I | N | I | R | N | 130 |
| F.heterosporum | 100 | T | D | N | A | R | K | E | I | V | V | S | V | R | G | S | I | N | V | R | N | 132 |
| F.oxysporum | 131 | L | V | S | G | C | G | V | H | S | G | F | Q | R | A | W | N | E | I | S | S | 163 |
| F.heterosporum | 133 | L | V | A | G | C | G | V | H | T | G | F | L | D | A | W | E | E | V | A | A | 165 |
| F.oxysporum | 164 | P | S | F | N | V | I | S | T | G | H | S | L | G | G | A | V | A | L | A | A | 198 |
| F.heterosporum | 166 | P | T | F | K | F | V | V | T | G | H | S | L | G | G | A | V | A | T | I | A | 198 |
| F.oxysporum | 197 | Y | T | Y | G | S | P | R | V | G | N | A | Q | L | S | A | F | V | S | N | Q | 229 |
| F.heterosporum | 199 | Y | T | Y | G | S | P | R | V | G | N | D | F | F | A | N | F | V | T | Q | T | 231 |
| F.oxysporum | 230 | V | P | R | L | P | P | I | L | I | F | G | Y | R | H | T | T | P | E | F | W | 262 |
| F.heterosporum | 232 | V | P | R | L | P | P | I | V | F | G | Y | R | H | T | S | P | E | Y | W | L | 263 |
| F.oxysporum | 263 | D | V | K | V | C | E | G | A | N | L | G | C | N | G | G | T | L | G | L | D | 285 |
| F.heterosporum | 264 | E | I | K | V | C | E | G | I | A | N | V | M | C | N | G | G | T | I | G | L | 290 |
| F.oxysporum | 296 | A | C | N | A | G | G | F | S | W | R | I | Y | R | S | A | E | S | V | D | K | 328 |
| F.heterosporum | 297 | T | C | A | P | I | A | I | P | M | K | R | I | Y | R | S | A | E | S | V | D | 316 |
| F.oxysporum | 328 | N | S | Y | V | Q | M | D | K | E | Y | V | K | N | N | Q | A | R | S | | | 346 |
| F.heterosporum | 319 | T | Q | Y | S | E | M | D | Q | E | F | V | K | Q | M | I | - | - | - | - | - | 333 |

Fig. 1

Fig. 2 Olie-ontgoming - Fusarium PL vs. Lecitase



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.